



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIANA DE SÁ ALVES

**IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES
METABOLÔMICOS SALIVARES E VIAS METABÓLICAS
ALTERADAS EM PACIENTES COM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

MARIANA DE SÁ ALVES

**IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES
METABOLÔMICOS SALIVARES E VIAS METABÓLICAS
ALTERADAS EM PACIENTES COM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janete Dias Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Levy Anderson César Alves

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Alves, Mariana de Sá

Identificação de possíveis biomarcadores metabolômicos salivares e vias metabólicas alteradas em pacientes com carcinoma de células escamosas bucal / Mariana de Sá Alves. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Janete Dias Almeida

Coorientadora: Levy Anderson César Alves

1. Metaboloma. 2. Carcinoma de células escamosas bucal. 3. Saliva. 4. Cromatografia Gasosa. 5. Espectrometria de massas. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Alves, Levy Anderson César, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Giuseppe Palmisano

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Ciências Biomédicas

Cidade Universitária

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 23 de fevereiro de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, fruto de lutas e alegrias, aos meus grandes amores:

À minha Mãe Adriana

Não há palavras ou gestos que possam medir o quanto sou grata à Deus por ter você ao meu lado. Muito Obrigada por sempre ter me apoiado nos obstáculos, por saber que podia contar com as suas orações, pela sua determinação para com a nossa família. Quando eu não pude acreditar, você me trouxe confiança e me ensinou que nada é impossível aos que creem em Deus e não desistem nas batalhas.

Você é o meu grande exemplo!

Ao meu Pai Carlos

Que com o seu jeito extrovertido sempre soube trazer alegria aos meus dias. Suas palavras de ânimo e sorrisos sinceros me fizeram refletir ao longo desses anos e perceber que atrás desse homem, existe alguém que sempre batalhou para que nossos sonhos fossem realizados.

Você é tudo para mim!

À minha Irmã Ana Beatriz

A sua dedicação para com todos e o seu carinho é algo que me renova diariamente e me deixa orgulhosa em poder compartilhar a vida ao seu lado. Observar a menina mulher de caráter que você tem se tornado, só traz felicidades as nossas vidas! Obrigada por dividir todos os momentos comigo! Ver-te tão guerreira, sempre me inspirou a ser uma pessoa melhor!

Você é a minha inspiração!

Ao meu namorado Heitor

Você me traz alegria, esperança e ânimo para os dias bons e ruins! Sua paciência me acalma e me faz ver que a vida é muito melhor quando compartilhada ao lado de quem amamos. Você é inspiração pela tua coragem e bom coração para com todos. Obrigada por tantos momentos e por sempre sonharmos e trilharmos os nossos caminhos juntos!

Você é o meu brilho no olhar!

Obrigada por me mostrarem o amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus por ter sido meu sustento e guia ao longo dessa jornada! Sem Ele e sem Nossa Senhora de Guadalupe, meus dias não teriam sido os mesmos! Quantas vezes vi sua mão poderosa sobre os meus sonhos, sobre os desafios e sobre o simples amanhecer de um novo dia. Obrigada por tanto!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Profa. Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira e do vice-coordenador Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria

À minha orientadora Profa. Tit. Janete Dias Almeida que sempre esteve de braços abertos para me acolher no grupo das “garotas fantásticas”. Desde sempre disposta a me ensinar desde da minha primeira biópsia (como não lembrar) até mesmo um preenchimento da anamnese. Obrigada pelo seu carinho, pelas suas palavras, por sempre me dizer “respira” e assim conseguir acalmar a minha alma ansiosa. O seu jeito de levar a vida com mais leveza sempre me inspira a realmente darmos valor no que importa e levamos dessa vida: o amor e respeito pelas outras almas humanas! Obrigada por tudo! Sempre levarei os conhecimentos e ensinamentos por toda a minha vida profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Dr. Levy Anderson César Alves, que sempre esteve disposto a me ajudar, seja durante uma reunião presencial ou durante as várias chamadas de vídeo. Obrigada por me apresentar a área tão desbravadora, inovadora e encantadora das “ômicas”. Todo o seu apoio foi fundamental para que as parcerias ocorressem e que novas amizades pudessem acontecer! Obrigada por tanto!

Aos professores da banca, Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito e Prof. Assoc. Giuseppe Palmisano que tão gentilmente aceitaram participar deste momento especial e, dividiram comigo suas experiências fazendo contribuições importantíssimas para lapidação deste trabalho.

À Dra. Maria Anita Mendes, como não te elogiar e te agradecer por tanto conhecimento! Inicialmente eu não saberia nem o que era o tal do “Metaboanalyst”, mas com a sua ajuda e parceria, realizamos inúmeras chamadas de vídeo, inúmeras reuniões, áudios pelo Whatsapp e idas para a USP para que esse e outros projetos pudessem acontecer. Obrigada por me ensinar tanto sobre metabólômica. Nunca

imaginei trabalhar nesta área e hoje me sinto cada dia mais apaixonada por uma área tão desafiadora! Tenho certeza que tudo isso foi fruto de todo o seu trabalho. Não há palavras e gestos que consigam te agradecer por tanto conhecimento ao nosso grupo de pesquisa de SJC, apenas GRATIDÃO por tudo!

Às professoras, Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango e Profa. Assoc. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante por todo apoio, carinho, conhecimento e oportunidades transmitidos ao longo desses anos. Vocês me ensinaram toda a didática, toda o conhecimento científico e técnico e ainda trouxeram alegria para os meus dias. Obrigada por cada oportunidade e por acreditarem em meu potencial. Serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr Herculano e Ma. Gabrielle, que sempre me acolheram tão bem na UFABC e estiveram dispostos a me auxiliar, seja durante uma reunião à distância ou durante nossos encontros presenciais. Obrigada pela parceria de sempre!

À Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder, por ser uma profissional tão dedicada em tudo que realiza! Seja na elaboração das aulas, quanto no laboratório, você é o meu exemplo de caráter, disciplina e dedicação. Obrigada por ter me ensinado tanto sobre patologia, didática e sobre como ser um ser humano melhor! Seus conselhos sempre me guiaram nos momentos de tomadas de decisões. Obrigada por sempre estar disposta a nos ajudar!

À Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira, por ter sido desde da época da graduação uma inspiração de profissional. Você que me apresentou ao mundo científico e sempre me deu oportunidades incríveis. Em especial pela oportunidade de utilizar o espaço dos laboratórios da Microbiologia e Imunologia e também pela oportunidade de aprender mais a como escrever os nossos artigos científicos. Meus sinceros agradecimentos!

À Profa. Dra. Liliana Scorzoni, que durante todo o mestrado me auxiliou na publicação dos nossos artigos científicos. Obrigada por toda a paciência em me auxiliar desde da formatação até a busca dos artigos nas bases de dados. Tudo que você me ensinou e ensina foram cruciais para o meu crescimento. Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado no período de Fevereiro/2019 a Setembro/2020.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado no período de Outubro/2020 a Fevereiro/2021.

Aos meus pais, Adriana e Carlos, embora eu já tenho dedicado este trabalho a vocês,

não posso deixar também de agradecer mais uma vez por todo incentivo e apoio de sempre. Meus pais sempre me ensinaram a buscar um pouco de conhecimento todo dia. Sempre há algo a se aprender, eles dizem! E realmente, não tenho dúvidas que é por meio da educação que o ser humano cresce na vida, tanto profissionalmente, quanto como ser humano capaz de respeitar a todos! Vocês são minha fortaleza e minhas inspirações! Obrigada por sempre me amarem profundamente e me auxiliarem nas batalhas cotidianas. Amo vocês para sempre!

A minha irmã, Ana Beatriz de Sá Alves, a quem também dediquei este trabalho. Todos dias esteve presente nos meus dias, seja ouvindo eu falar sobre a pesquisa ou seja me alegrando com seus sonhos! Eu sei o quanto você ama a pesquisa e ama falar sobre a garra da mulher pesquisadora. Espero que todos os seus sonhos sejam conquistados, pois sua determinação é muito evidente para todos! Te admiro e te amo para sempre, Ana, você sempre foi um sonho de irmã para mim e sempre será a minha preciosidade! Obrigada por ser a minha grande amiga!

Ao meu namorado Heitor Miranda Moreira, por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar em todos os sonhos. Você que sempre me ensinou desde do “excel” até a acreditar mais em mim do que eu mesma. Com você eu entendi que o amor é construído diariamente, nas coisas simples da vida e nas suas abdições de afazeres para a realização dos nossos sonhos juntos! Obrigada por sempre contar com você como minha “duplinha”, como minha fortaleza, meu “help” diário da informática e meu ponto de compreensão e paciência. Seu amor e companheirismo são incondicionais! Eu te amo!

À minha dupla, amiga e parceira para todas as horas Juliani Caroline Ribeiro de Araújo, pela sua preciosa amizade! Desde da graduação temos sido o ponto de apoio uma da outra e é tão bom poder ainda contar contigo na pós-graduação. Nossas conversas, aprendizados e ensinamentos dentro e fora das clínicas foram o que tornaram essa amizade inesquecível. Muito obrigada por cada conselho e ajuda nas horas mais difíceis e também pelo seu companheirismo nas horas mais inusitadas e divertidas. Agradeço a Deus por ter me presenteado com essa amizade!

Às minhas colegas de mestrado, ou ainda, irmãs da família “Almeida”: Keila, Bruna e Nayara, o meu muito obrigada!

À Keila que sempre me ensinou o que é determinação, que sempre me ensinou desde como montar uma aula até como ser mais proativa e desbravadora. Obrigada pela nossa amizade! Obrigada pelos inúmeros almoços e lanches divertidos, pelas conversas pela salinha e por ainda mantermos a amizade mesmo à distância. Ver você trilhar esse caminho tão lindo aí longe, me traz alegria ao coração, pois seu o quanto você merece todas as oportunidades incríveis, brilhe muito aonde estiver!

À Nayara, que desde do primeiro dia, me acolheu como uma verdadeira irmã “Sá”. Nunca vou me esquecer dos inúmeros cafés em sua casa, da sua risada contagiante e da sua disponibilidade em sempre auxiliar em tudo. Nunca me esqueço o quanto você me auxiliava na clínica, nas montagens de aula e de projetos. Você que me auxiliou até mesmo a “subir” as inúmeras escadas rolantes de São Paulo e se aventurou comigo no ramo das “ômicas”. Obrigada pela sua amizade! Agradeço demais!

À Bruna, que é uma inspiração para todas da família “Almeida”. Você me ensinou desde da didática de uma aula online até mesmo a como ensinar na clínica. O ano de 2020, embora tenha sido de forma não tão presencial, me trouxe você para mais perto. Eu pude conhecer a Bruna que é organizada, determinada, dedicada demais e ao mesmo tempo de um coração gigantesco! E como, Brasil! Você sempre esteve disposta a me ajudar, seja ouvindo meus desabafos, seja me auxiliando em alguma estatística. Obrigado por ter se tornado tão especial! Quero sua amizade para sempre!

À Mônica, que é a “filha” mais experiente, dedicada e inspiração de todas! Não tenho sequer gestos para agradecer o quanto você fez e tem feito por mim ultimamente. Desde as idas à São Paulo juntas, até mesmo as rotinas de laboratório, tudo que eu aprendo contigo presencialmente ou por meio das inúmeras ligações e vídeo chamadas, foram cruciais para que este trabalho existisse e para hoje eu pudesse ser um pouco melhor do que ontem. Obrigada também ao Marcus, marido da Mônica, que sempre esteve disposto a nos auxiliar nos inúmeros dados e planilhas que tínhamos. Enfim, para mim você é minha inspiração, Mônica, e eu agradeço muito a Deus ter me aproximado mais de ti nesses últimos anos. Você traz alegria e ânimo por onde passa e é por isso que eu amo estar ao seu lado. Obrigada por tanto!

Às minhas alunas de iniciação científica, Milena da Silva Moreira e Giovanna Vitoria Schmitz. Vocês sempre foram extremamente organizadas, proativas, amáveis e dedicadas em cada passo dessa caminhada. O meu anjo da guarda foi muito bom para comigo ao me abençoar com a presença de vocês! Continuem assim, tão persistentes, que eu não tenho dúvidas do futuro brilhante que vocês têm pela frente!

A todos os alunos para os quais tive o prazer de ministrar as primeiras aulas EAD, meus sinceros agradecimentos para as Turmas T20 e T64. O ano de 2020 foi desafiador demais para vocês, alunos e também para nós, professores. Portanto, eu não poderia deixar de agradecer por todo o apoio e desafios que vocês me propuseram. Obrigada pela acolhida e realização profissional que vocês trouxeram! Nunca esquecerei de vocês!

Aos pacientes que confiaram suas vidas em minhas mãos. Muito obrigada pela confiança e paciência ao longo desta jornada!

Ao Carlos Guedes e Michele Ramos dos Santos, pela paciência em me ajudar inúmeras vezes quando necessário.

À todos os professores pelo convívio durante a realização dos créditos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Clínica de Propedêutica, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, que foram essenciais para qualidade da pesquisa e atendimento clínico.

Aos meus amigos da pós graduação, os queridos amigos da Salinha, meus sinceros agradecimentos por cada café e risadas compartilhadas!

A todos os funcionários do ICT-UNESP, em especial à equipe da Seção Técnica de Pós Graduação, pela paciência e prontidão no atendimento durante esse período.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico.

À minha querida família, na figura representativa de meus tios, tias, primas, primos e amigos, sou grata pelo cuidado e apoio de todos nos momentos difíceis e felizes!

A todos, enfim, que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

Josué 1:9

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
1 INTRODUÇÃO	20
2 PROPOSIÇÃO	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Aspectos éticos	31
3.2 Seleção das amostras	31
3.2.1 Grupo carcinoma de células escamosas bucal	32
3.2.2 Grupo controle.....	32
3.3 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico	33
3.4 Avaliação do perfil etílico	35
3.5 Coleta e armazenamento das amostras salivares	35
3.6 Transportes das amostras salivares	36
3.7 Preparo e análise metabolômica das amostras salivares.....	36
3.8 Análise estatística	40
3.8.1 Análise descritiva dos dados clínicos	40
3.8.2 Análise do perfil metabolômico	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Casuística das amostras.....	42
4.2. Perfil tabágico e etílico.....	44
4.3 Análise metabolômica.....	47
4.3.1 Diagrama de Venn entre o grupo CCEB e grupo controle	47
4.3.2 Análise dos componentes principais entre o grupo CCEB e grupo controle	51

4.3.3 Análise de <i>cluster</i> hierárquico entre o grupo CCEB e grupo controle	52
4.3.4 Análise dos metabólitos significantes entre o grupo CCEB e grupo controle	55
4.3.5 Análise das vias metabólicas alteradas no grupo CCEB.....	57
4.3.6 Análise de possíveis biomarcadores salivares para o grupo CCEB	73
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	100
ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando as principais áreas que abrangem as “ômicas” e destacando o papel dos metabólitos na expressão dos fenótipos	24
Figura 2 – Esquema representando todo o processo de extração e derivatização dos metabólitos das amostras salivares até sua injeção no GC-MS	39
Figura 3 – Gráfico em barras agrupadas para a distribuição dos pacientes em relação ao estágio da doença.....	44
Figura 4 – Diagrama de Venn para os metabólitos salivares	48
Figura 5 – <i>Score plot</i> com os 5 principais componentes	51
Figura 6 – Gráfico do PCA entre o grupo CCEB e controle.....	52
Figura 7 – Dendrograma entre grupo CCEB e grupo controle	53
Figura 8 – <i>Heatmap</i> entre o grupo CCEB e o grupo controle	54
Figura 9 – Principais vias metabólicas alteradas nos pacientes com CCEB	58
Figura 10 – Padronização dos nomes dos metabólitos	59
Figura 11 – Gráfico em barras representando as vias metabólicas mais significantes do grupo CCEB.....	61
Figura 12 – Curva ROC do ácido málico	75
Figura 13 – Curva ROC da lactose.....	76
Figura 14 – Curva ROC do catecol.....	76

Figura 15 – Curva ROC do ácido 2-cetoadípico	77
Figura 16 – Curva ROC da maltose	77
Figura 17 – Curva ROC da metionina	78
Figura 18 – Curva ROC da Ureia	78
Figura 19 – Curva ROC da leucina.....	79
Figura 20 – Curva ROC da inosina.....	79
Figura 21 – Curva ROC do ácido protocatecuico	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação do grau de dependência nicotínica segundo o teste de Fagerström (TFDN)	34
Quadro 2 – Classificação do grau de risco do uso do álcool segundo o AUDIT.	35
Quadro 3 – Metabólitos salivares analisados no diagrama de Venn.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil sociodemográfico dos pacientes da amostra.....	43
Tabela 2 – Perfil tabágico e etílico dos pacientes.....	46
Tabela 3 – Tabela com os metabólitos estatisticamente significativos.....	55
Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB.....	62
Tabela 5 – Análise da curva ROC para biomarcadores	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUDIT	<i>Alcohol Use Disorder Identification Test</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCEB	Carcinoma de Células Escamosas Bucal
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CFM	Conselho Federal de Medicina
CID	Classificação Internacional de Doenças
COMET	<i>Consortium for Metabonomic Toxicology</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.O.U	Diário Oficial da União
EPUSP	Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
GC-MS	Espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa
HPLC-MS	Espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência
ICT - UNESP	Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NIC	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFDN	Teste de Fagerström para Dependência à Nicotina
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>

UNESP	Universidade Estadual Paulista
UPLC-MS	<i>Ultra performance liquid chromatography - mass spectrometer</i>
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>

Alves MS. Identificação de possíveis biomarcadores metabolômicos salivares e vias metabólicas alteradas em pacientes com carcinoma de células escamosas bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) representa 90% das neoplasias malignas da região intrabucal. O desenvolvimento dessa doença é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais que podem ser, muitas vezes, desconhecidos e que podem apresentar modificação das vias metabólicas. Assim, o objetivo desta pesquisa foi identificar os metabólitos salivares de pacientes com CCEB na busca de vias metabólicas alteradas, assim como possíveis biomarcadores metabólicos. Os metabólitos salivares de 27 pacientes com CCEB foram comparados aos metabólitos de 41 pacientes controles. As amostras de metaboloma salivar foram analisadas por meio de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS). Os resultados indicaram 26 metabólitos específicos para o grupo CCEB e 5 específicos do grupo controle. No diagrama de Venn foram observados 77 metabólitos comuns aos dois grupos. Esta análise foi crucial para a descoberta de três vias metabólicas com diferença estatística entre os grupos: a lançadeira malato-aspartato, a via do metabolismo da beta-alanina e o efeito Warburg. Todas essas vias relacionam-se com a produção de energia celular na carcinogênese, promovendo um ambiente favorável para o alto consumo energético e sobrevivência celular. Ao comparar os metabólitos salivares de pacientes controles e com câncer bucal, 40 metabólitos foram capazes de distinguir os grupos estatisticamente, sendo 20 metabólitos aumentados nos pacientes com carcinoma e 20 aumentados nos pacientes sem a doença. Com a finalidade de identificar os metabólitos como possíveis biomarcadores salivares, a curva ROC foi traçada e um corte de 0,8 no AUC foi construído descobrindo-se 24 metabólitos. Após um novo corte nos metabólitos com AUC de 0,9, metabólitos como ureia, leucina, inosina e metionina puderam ser explorados como candidatos a biomarcadores metabolômicos salivares de pacientes com CCEB já relatados na literatura. Além destes, 6 outros metabólitos apresentaram AUC acima de 0,9 e são relatados pela primeira vez em um estudo de metaboloma salivar de pacientes sul-americanos com câncer bucal, são estes: o ácido málico, maltose, ácido protocatecuico, lactose, ácido-2-cetoadípico e catecol. Essas alterações metabólicas auxiliam na descoberta de biomarcadores salivares de pacientes com câncer bucal e despertam o interesse para que haja outros estudos com maior número de amostras no intuito de validar nossos resultados.

Palavras-chave: Metaboloma. Carcinoma de células escamosas bucal. Saliva. Cromatografia Gasosa. Espectrometria de massas.

Alves MS. Identification of possible salivary metabolomic biomarkers and altered metabolic pathways in patients with oral squamous cell carcinoma [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (CCEB) represents 90% of intraoral malignant neoplasms. The development of this disease is multifactorial, involving genetic and environmental factors that can often be unknown and can present the modification of metabolic pathways. Thus, the objective of this research was to identify the salivary metabolites of patients with CCEB in the search of altered metabolic pathways, as well as possible metabolic biomarkers. The salivary metabolites of 27 patients with CCEB were compared to the metabolites of 41 control patients. The salivary metabolome samples were analyzed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The results indicated 26 specific metabolites for the CCEB group and 5 specifics for the control group. In the Venn diagram 77 other metabolites common to both groups were observed. This analysis was crucial for the discovery of three metabolic pathways with statistical difference between the groups: the malate-aspartate shuttle, the beta-alanine metabolism pathway and the Warburg effect. All of these pathways are related to the production of cellular energy in carcinogenesis, promoting a favorable environment for high energy consumption and cell survival. When comparing the salivary metabolites of control patients with oral cancer, 40 metabolites were able to distinguish the groups statistically, with 20 metabolites increased in patients with carcinoma and 20 increased in patients without the disease. In order to identify the metabolites as possible salivary biomarkers, the ROC curve was drawn and a cohort of 0.8 in the AUC was performed by discovering 24 metabolites. After a new cohort of metabolites with AUC of 0.9, metabolites such as urea, leucine, inosine and methionine could be explored as possible salivary metabolomic biomarkers of patients with CCEBs already reported in the literature. In addition to these, 6 other metabolites showed AUC above 0.9 and are reported for the first time in a study of salivary metabolome in South American patients with oral cancer, these are: malic acid, maltose, protocatechuic acid, lactose, 2-ketoadipic and catechol. These metabolic changes help in the discovery of salivary biomarkers of patients with oral cancer and arouse interest for further studies with a larger number of samples in order to validate our results.

Keywords: Metabolome. Oral carcinoma Squamous Cell. Saliva. Gas Chromatography. Mass Spectrometry

1 INTRODUÇÃO

O câncer bucal refere-se ao conjunto de neoplasias malignas que acometem os lábios e outras regiões intrabucais (INCA, 2020). Dentre as neoplasias malignas bucais, o carcinoma de células escamosas (CCEB) é o tipo histológico mais prevalente, representando aproximadamente 90% dos casos (Neville, Day, 2002; OMS, 2015). Infelizmente, cerca de 50% dos casos são diagnosticados em estágios avançados (III e IV) (Scott et al., 2005; Seoane et al., 2009) o que implica em piores prognósticos, aumento dos custos e elevada taxa de mortalidade (Fontes et al., 2008; Güneri, Epstein, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou em seus dados epidemiológicos que a incidência de câncer bucal, incluindo lábio e cavidade bucal, anualmente é uma das mais altas do mundo, com mais de 300 000 novos casos em 2018. Estima-se que em 2040, aproximadamente 500 000 indivíduos recebam o diagnóstico de câncer bucal segundo a OMS. Além disso, a previsão da taxa de mortalidade anual para o câncer bucal é de 300 000 mortes no ano de 2040 (WHO, 2018).

No Brasil, o CCEB ocupa a quinta posição dos cânceres com maior prevalência em homens e o décimo-primeiro em mulheres. A região sudeste é uma das mais afetadas, ocupando a quarta posição para os pacientes do sexo masculino (INCA, 2020), dados semelhantes ao que ocorre pelo mundo, no qual o câncer de boca é duas vezes mais prevalente em homens do que em mulheres (Warnakulasuriya, 2009). Diante dos dados, o câncer bucal é um problema altamente relevante para a saúde pública global, pois apesar do progresso em pesquisas e terapias atuais, os dados não demonstram melhora significativa nos últimos anos (Rivera, 2015).

Os fatores etiológicos predominantes para o câncer bucal estão bem estabelecidos na literatura e incluem o uso do tabaco e álcool que agem como substâncias carcinogênicas responsáveis por constituir a “cancerização de campo” (Sahingur, Yeudall, 2015). Dentre esses fatores de risco, o tabagismo chama a atenção por ser responsável por mais de 8 milhões de mortes por ano entre as doenças tabaco-relacionadas (OMS, 2020), incluindo o câncer bucal, câncer de

esôfago, câncer de pâncreas, câncer de laringe, câncer de pulmão, infecções respiratórias, acidentes cerebrovasculares e ataques cardíacos (CDC, 2020; Chang et al., 2015).

Em 1988, em um relatório norte-americano, a nicotina foi considerada a substância presente nos produtos do tabaco que seria a responsável pelo caráter adicto (HHS, 1988), uma vez que foi declarada como uma substância psicoativa capaz de produzir alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) por meio da liberação de dopamina e outros neurotransmissores que estimulam as sensações de prazer no ato de fumar (INCA, 2020). Devido às características de substância capaz de induzir abuso e dependência, o tabagismo foi incluído na Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças da Organização Mundial de Saúde (CID – 10) integrando o grupo de transtornos comportamentais e mentais decorrentes do uso de drogas psicoativas (DATA SUS, 2020).

Além da nicotina, a fumaça do tabaco contém mais de 7.000 compostos e substâncias químicas (American Cancer Society, 2020; American Lung Association, 2020; CDC, 2020; FDA, 2020), nos quais mais de 200 são prejudiciais à saúde e 69 são substâncias altamente carcinogênicas (American Cancer Society, 2020; American Lung Association, 2020; OMS, 2015). Logo, o tabaco é considerado um agente promotor e iniciador da carcinogênese (Scully, 2011; Winn, Ph, 2001), enquanto que o uso concomitante de tabaco e álcool contribui significativamente para o aumento da incidência do CCEB; sendo essa probabilidade 38 vezes maior em homens que consomem álcool e tabaco concomitantemente quando comparada aos homens que não possuem esses hábitos (Znaor et al., 2003).

O processo de carcinogênese é algo complexo que ocorre em níveis de fenótipo e genótipo, de forma que ocorram alterações genéticas e epigenéticas que sofrem influências hereditárias ou ambientais (Califano et al., 1996; Santosh et al., 2016; Thomson, 2012). O fato é que, o quanto antes essas alterações forem detectadas, mais precocemente a doença será descoberta, obtendo-se melhores prognósticos para os pacientes (Mikkonen et al., 2016). Essas alterações em moléculas biológicas envolvidas no mecanismo da carcinogênese, chamados de “biomarcadores”, podem fornecer dados diagnósticos valiosos acerca do processo neoplásico em questão (Santosh et al., 2016).

Existem várias definições e explicações sobre biomarcadores na literatura, visto que encontrar um biomarcador para doenças crônicas e neoplasias malignas tem sido o principal alvo das pesquisas mundialmente (Mishra, Verma, 2010). Segundo o *National Cancer Institute* (NCI), uma das agências responsáveis pelo Departamento de Saúde e Serviços dos Estados Unidos, biomarcador é uma substância que pode ser objetivamente medida e avaliada para indicar processos patogênicos, processos biológicos ou alterações na resposta do hospedeiro frente a tratamentos farmacológicos (NCI, 2020). A OMS define um biomarcador como uma substância que pode ser avaliada quantitativamente em um indivíduo e cita que essas substâncias ou seus produtos influenciam e predizem sobre a doença em questão (WHO, 2001).

O estudo de Rai e colaboradores (2018) demonstrou que apesar das inovações tecnológicas no tratamento do câncer bucal, grande parte dos pacientes é diagnosticada com a doença em estágios avançados, o que implica em possibilidades diminutas de cura. Atualmente, o tratamento para o câncer bucal apresenta a cirurgia como padrão ouro, seguido pelos tratamentos de radioterapia e quimioterapia que demonstram taxas de sobrevivência ruins no período de 5 anos (Moro et al., 2018). Com relação a esses dados, o diagnóstico precoce por meio de biomarcadores precisos e consistentes para o câncer bucal, poderiam orientar a detecção precoce e escolha de melhores tratamentos direcionados para cada paciente.

Os biomarcadores podem ser utilizados não somente para o auxílio da detecção precoce de determinadas doenças, como o câncer bucal, ademais como substâncias capazes de estimar o risco de ocorrência da doença, discriminar processos benignos de malignos, determinar prognósticos, detectar recorrências e progressões assim como respostas às terapias realizadas. Concomitantemente a essas possibilidades, destacamos o papel dos biomarcadores em realizar triagens eficientes e monitoramento da saúde geral dos indivíduos. Portanto, essas estratégias poderiam ser utilizadas em populações de risco para determinadas patologias; como no câncer bucal realizar triagens em pacientes que fazem uso do tabaco e álcool simultaneamente, e assim melhorar todo o processo de tratamento desses pacientes, desde a detecção em fase precoce até a determinação dos melhores tratamentos. (Wang et al., 2014).

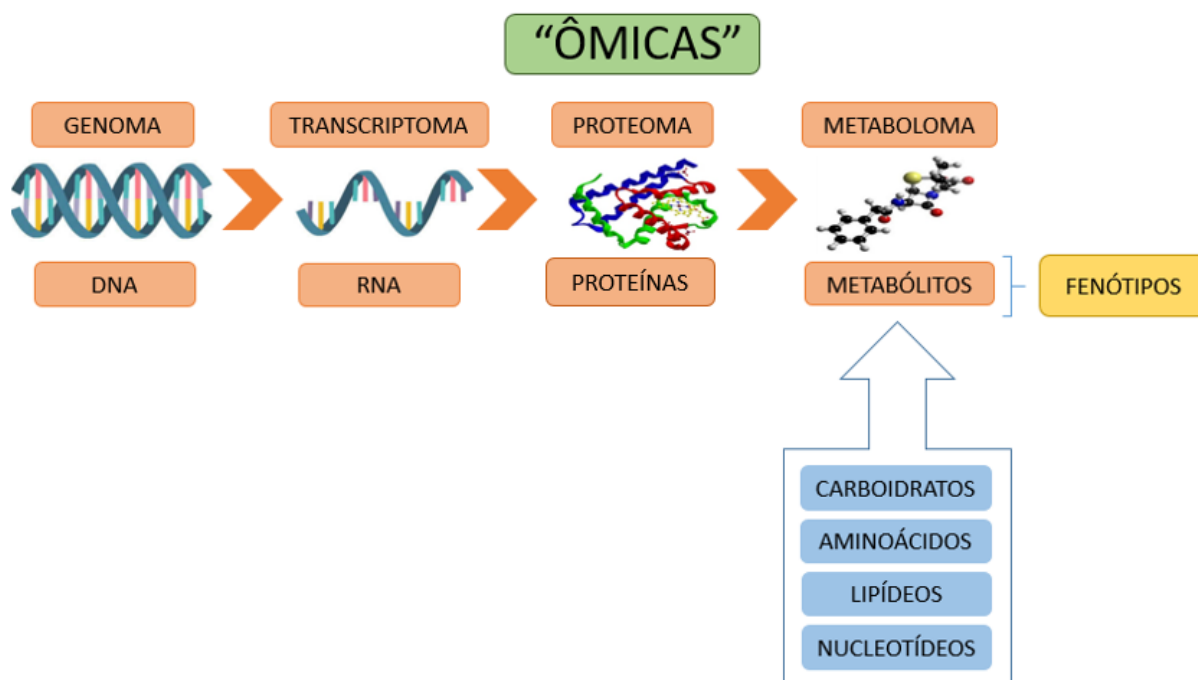
A identificação de biomarcadores tem ganhado importância no ramo das “ômicas”, termo esse utilizado para o estudo global dos sistemas biológicos, ou seja,

é através das “ômicas” que é possível identificar, quantificar e caracterizar todos os sistemas celulares e as vias intracelulares (Wang et al., 2010). Assim, abrangendo as “ômicas” temos a genômica, área que estuda os genomas; transcriptômica, área que estuda o transcriptoma; proteômica que estuda o proteoma e metabolômica que estuda o metaboloma de uma determinada amostra biológica. Logo, as “ômicas” constituem um ramo promissor para os estudos das moléculas no processo saúde-doença que possibilitam analisar desde o genoma até os metabólitos de um paciente (Wei et al., 2011).

Destaca-se a metabolômica como uma das mais recentes áreas das “ômicas” por empregar técnicas analíticas de última geração para reconhecer e estudar as alterações metabólicas em indivíduos que estejam com algum processo patofisiológico ou sejam submetidos a intervenções farmacológicas e modificações genéticas (Clayton et al., 2006; Fiehn, 2002; Holmes et al., 2008). O propósito de estudar as alterações metabolômicas se dá pelo motivo de que os metabólitos expressam alterações fenotípicas, ou seja, as vias metabólicas são capazes de sofrerem alterações de um indivíduo para o outro frente à submissão de diferentes fatores ambientais, alterações microbianas, desregulações genéticas e determinadas patologias (Beger, 2013; Clayton et al., 2006; Fiehn, 2002; Holmes et al., 2008; Lindon, Nicholson, 2014).

A descrição analítica dos metabólitos representativos em amostras biológicas podem conter pequenas moléculas como lipídios, colesterol, ácidos nucleicos e outras (Zhao, 2013). Os genes e proteínas de uma determinada amostra estão sujeitos a alterações por processos epigenéticos, enquanto os metabólitos expressam todos os produtos finais de um fenótipo de um indivíduo. Logo, ao estudar o metaboloma é possível observar diversas alterações mais complexas, visto que alterações em um único gene ou em uma única proteína refletem em alterações em cascata nas vias metabólicas (Alves, 2016). Para exemplificar a área das “ômicas”, um esquema foi elaborado (Figura 1).

Figura 1 – Esquema representando as principais áreas que abrangem as “ômicas” e destacando o papel dos metabólitos na expressão dos fenótipos



Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto Metaboanalyst 5.0.

Os metabólitos, de forma geral, estão continuamente em um processo dinâmico de serem degradados, absorvidos e sintetizados nos seres vivos (Bennett et al., 2005). Esse dinamismo é designado por via metabólica, responsável pela manutenção da vida por meio de reações químicas no qual enzimas conseguem catalisar substâncias que geram um produto final, o qual também pode ser substrato para outras reações químicas. Portanto, a compreensão das vias metabólicas é um processo complexo e não completamente entendido, uma vez que a resposta metabólica relaciona-se com a regulação celular dos tecidos, órgãos e todo o organismo, que ao se modificar pode alterar inúmeras vias (Lindon, Nicholson, 2014).

A metodologia da metabolômica ganhou repercussão quando a *Imperial College of London* juntamente com cinco grandes empresas farmacêuticas mundiais formaram um grupo de pesquisa para avaliar as principais metodologias de espectrometria e gerar bancos de dados metabólicos na avaliação da toxicidade da urina e sangue de roedores que eram submetidos aos testes toxicológicos das

principais drogas farmacêuticas. O projeto alcançou bons resultados e com isso deu origem ao *Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET)*, reconhecido por ser um dos pioneiros na análise dos metabólitos presentes em biofluidos (Lindon, 2005).

A análise dos metabólitos pode ser dividida em quatro grupos: (1) “*fingerprinting*” metabólico, (2) perfil metabólico, (c) análise direcionada e (d) metabolômica. No entanto, devido às complexidades envolvidas no estudo dos metabólitos, frequentemente utilizamos a palavra metabolômica para descrever a nova área da ciência responsável pela análise dos metabólitos, em detrimento de uma abordagem analítica específica. Portanto, do ponto de vista analítico, o metaboloma pode ser subdividido em: (1) análise direcionada e (2) perfil metabólico não direcionado, sendo esse subdividido em (2a) “*fingerprinting*” metabólico, o qual estuda os metabólitos intracelulares e (2b) “*footprinting*” metabólico, o qual analisa os metabólitos extracelulares (Fiehn, 2002).

O estudo da metabolômica direcionada tem por objetivo analisar mais profundamente um grupo de metabólitos já pré-definidos, ou seja, que tenham sido identificados durante análises anteriores de metabolômica não direcionada. Logo, o estudo da metabolômica não direcionada tem por objetivo descobrir quais são os metabólitos ou produtos derivados deles, identificáveis ou não, e que estes metabólitos sejam detectados em amostras biológicas por meio de técnicas analíticas específicas determinando a sua identificação e uma estimativa de sua quantificação (Villas-Bôas, Gombert, 2006).

Para estudar a metabolômica, a metodologia se baseia nas técnicas analíticas como espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier (FTIR), espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS) e espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa (GC-MS) (Markley et al., 2018; Rai et al., 2018; Zhang et al., 2012). A espectrometria de massas (MS) é a técnica analítica responsável por ionizar as espécies químicas presentes na amostra biológica de interesse e assim classificar os íons de acordo com sua taxa de massa/carga (m/z), desse modo a espectrometria gera um espectro de massa para cada espécie química, possibilitando a sua quantificação e qualificação (Ohshima et al., 2017; Ye et al., 2014).

A metabolômica adquirida através da cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (GC-MS) é a metodologia considerada “padrão ouro” devido as suas vantagens (Lu et al., 2008) como identificação e quantificação de pequenos metabólitos moleculares (<650 daltons), incluindo açúcares (DeJongh et al., 1969), aminoácidos (Gelpi et al., 1969), ácidos graxos (Niehaus et al., 1968), hormônios (Gréen et al., 1969), catecolaminas (Anggård et al., 1969), drogas e outras toxinas, sendo muitas vezes necessário também uma etapa de derivatização química para tornar estes compostos voláteis e estáveis para a cromatografia gasosa (Fiehn, 2016).

Logo, a técnica analítica da espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa (GC-MS) é capaz de identificar e analisar separadamente cada composto (Wu, Colby, 2016). Essa técnica tem apresentado alta reprodutibilidade, sensibilidade, resolubilidade e um banco de dados bem completo, o que traz confiabilidade para os resultados das pesquisas, além do baixo custo e facilidade de manuseio ao compararmos com as técnicas de HPLC-MS ou RMN (Khodadadi, Pourfarzam, 2020).

Uma das principais diferenças entre as outras técnicas metabolômicas, como a técnica de cromatografia líquida-MS e a GC-MS, é que a GC-MS necessita de uma etapa de derivatização dos compostos. Esta parte é essencial para que os compostos se tornem derivados voláteis e termicamente mais estáveis para terem seus perfis quantificados. Entretanto, essa etapa de derivatização e fragmentação dos metabólitos exige métodos específicos de identificação, quantificação, normalização e filtragem de todos os dados, isso implica que qualquer erro nessa etapa pode ser capaz de alterar completamente os dados, sendo portanto uma das desvantagens da técnica (Beale et al., 2018; Papadimitropoulos et al., 2018).

A aplicabilidade da metabolômica é imensa em diversas condições patológicas como carcinoma hepatocelular e câncer colorretal, como demonstrado por Beger et al. (2013). Devido ao fato do câncer alterar as vias metabólicas e consequentemente os produtos finais dessas vias, o monitoramento das mudanças fornece indícios cruciais para o diagnóstico precoce dos pacientes (Kaddurah-daouk et al., 2008; Mikkonen et al., 2016). Para a análise metabolômica, frequentemente utiliza-se biofluidos - urina, sangue e saliva - como espécimes clínicas dos pacientes (Mikkonen et al., 2016).

A saliva é um fluido bucal capaz de espelhar as condições de saúde bucal e sistêmica dos indivíduos (Chicharro et al., 1998) em virtude de sua composição valiosa de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, enzimas, hormônios, anticorpos, eletrólitos, constituintes antimicrobianos, fatores de crescimento e outras moléculas associadas ao fenótipo do indivíduo e inclusive suas doenças (Bigler et al., 2009; Samaranayake, 2007; Wong, 2006). A principal função da saliva é conhecida como digestão, deglutição, degustação e lubrificação da mucosa bucal, entretanto, sabe-se que além dessas funções, a saliva atua como substância protetora contra patógenos e toxinas devido à sua composição diversificada, citada anteriormente (Humphrey, Williamson, 2001).

A saliva, importante para a qualidade de vida das pessoas, é originada pela secreção de três importantes glândulas salivares maiores, as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, além das glândulas salivares menores presentes por quase toda a mucosa bucal (Wong, 2006). Devido ao fato de conter as inúmeras moléculas e substâncias citadas anteriormente e ser uma das primeiras “frentes” de batalha do corpo, a saliva é designada como uma das amostras biológicas promissoras no estudo de biomarcadores patogênicos específicos, haja vista que é utilizada como método diagnóstico há mais de 2000 anos pela medicina tradicional chinesa (Wong, 2006). Assim, os biomarcadores salivares podem ser futuramente utilizados para examinar o estado de saúde de indivíduos comprometidos e monitoramento de doenças (Mcmurray et al., 2008; Streckfus et al., 2010), visto que a saliva pode ser facilmente coletada em ambientes odontológicos e médicos (Ma et al., 2012). A facilidade da coleta não invasiva, transporte e armazenagem das amostras salivares em comparação a outras formas econômicas como urina e sangue, têm permitido que a classe de cientistas médico-odontológica investigue cada vez mais os biomarcadores presentes na saliva humana frente a processos patológicos (Zhang et al., 2012).

A metabolização de amostras salivares, ou advindas de tecidos e outros biofluidos, apresentou alteração em estudos preliminares em quase todos os tipos de câncer (Vander Heiden et al., 2009; Seyfried, Shelton, 2010). Esse fenômeno de alteração das vias metabólicas ocorre independentemente do tipo de câncer, visto que moléculas como o glutamato e a glicose são utilizadas pelas células cancerígenas para produzirem energia e assim realizarem a síntese de aminoácidos, ácidos graxos

e nucleotídeos que serão utilizados na produção de novas proteínas para continuar a proliferação celular que ocorre em qualquer tipo de câncer (Vander Heiden et al., 2009; Kim, Dang, 2006). Assim, o entendimento das vias metabólicas por meio do estudo do metaboloma tem despertado o interesse da comunidade científica farmacêutica para desenvolver melhores quimioterápicos para essa patologia. (Brown et al., 2012).

Ishiwa et al. (2016) realizaram a análise salivar dos metabólitos presentes na saliva de pacientes com câncer bucal em um grupo controle, no qual obtiveram 45 metabólitos com diferença estatística entre os grupos. O câncer bucal envolvido era predominantemente do tipo histológico carcinoma de células escamosas (88%), seguido pelo melanoma oral maligno (8%) e outros tipos não identificados (4%). Dentro dos metabólitos descobertas por estes pesquisadores, apenas dois seriam capazes de discriminar corretamente as amostras controle das amostras com câncer bucal, sendo o S-adenosilmetionina (SAM) e pipecolato. Outros autores descrevem as poliaminas como possíveis biomarcadores para diversos tipos de câncer (Giskeødegga et al., 2013; Liu et al., 2013; Sugimoto et al., 2010; Takayama et al., 2016).

Por meio da análise metabolômica salivar de pacientes com câncer de boca, mama e pâncreas, 57 perfis metabolômicos específicos para os determinados cânceres foram estudados por Sugimoto e colaboradores (Sugimoto et al., 2010). Wang et al. (2014) utilizaram a metodologia de cromatografia líquida de ultradesempenho (UPLC-MS) para analisar os metabólitos das amostras salivares de pacientes com câncer bucal. Dentre os seus resultados, 14 metabólitos foram descritos como modificados nas amostras, sendo cinco deles, propionilcolina, N-acetil-L-fenilalanina, esfinganina, fitoesfingosina e S-carboximetil-L-cisteína, possíveis candidatos a biomarcadores para o câncer de boca. Já no estudo de Wei e colaboradores (2011), três possíveis biomarcadores foram identificados, valina, ácido láctico e fenilalanina como úteis para o possível diagnóstico de metaboloma salivar em pacientes com câncer bucal.

No entanto, os biomarcadores candidatos dos estudos prévios necessitam ser amplamente validados por meio de estudos com amostras salivares de populações étnicas diferentes, tal como população sul-americana, além do estudo das vias metabólicas alteradas. Destarte, esse estudo apresenta grande importância, haja vista

que a integração dos biomarcadores com as ferramentas atuais de diagnóstico podem contribuir grandiosamente para o diagnóstico precoce dos pacientes.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Investigar os metabólitos salivares de pacientes com carcinoma de células escamosas bucal identificando as vias metabólicas alteradas, assim como possíveis biomarcadores por meio da técnica analítica da metabolômica não direcionada e traçar um perfil dessas amostras para o rastreamento não invasivo da doença.

2.2 Objetivos específicos

- a) identificar metabólitos salivares de pacientes com carcinoma de células escamosas bucal (grupo paciente);
- b) identificar metabólitos salivares de pacientes sem o diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucal (grupo controle);
- c) comparar os metabólitos salivares de pacientes com CCEB e sem CCEB;
- d) identificar as vias metabólicas alteradas nos pacientes com CCEB;
- e) classificar os possíveis biomarcadores salivares para rastreamento não invasivo do câncer bucal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos (ICT- Unesp), como parte do estudo intitulado “Tabagismo e sua inter-relação com leucoplasia e carcinoma de células escamosas bucal: análise metabólica e citomorfogenética”, CAAE 132828.19.7.0000.0077, parecer número 3.334.281/2019 (ANEXO A).

3.2 Seleção das amostras

Os pacientes selecionados foram esclarecidos acerca dos objetivos, proposições e condições deste projeto e aqueles que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Após o aceite, todos os pacientes foram submetidos ao exame físico extra e intrabucal. Além dos exames, os pacientes preencheram um questionário em forma de entrevista, sobre questões relacionadas à frequência e quantidade consumida de cigarros e bebidas alcoólicas (APÊNDICE B – Parte I).

A seleção dos pacientes foi dividida em dois grupos conforme:

- a) grupo carcinoma de células escamosas bucal;
- b) grupo controle.

3.2.1 Grupo carcinoma de células escamosas bucal

O grupo foi constituído de 39 pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) que entraram para atendimento nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Municipal José Carvalho de Florence na cidade de São José dos Campos/SP (com a colaboração do Dr. Celso Muller Bandeira), do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (com a colaboração do Prof. Dr. José Francisco Sales Chagas) e do Hospital Municipal Mário Gatti de Campinas/SP (com a colaboração da Profa. Dra. Maria Beatriz Nogueira Pascoal).

Os critérios de inclusão foram os pacientes apresentarem idade acima de 18 anos concomitante com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucal. O critério de exclusão foi o fato do paciente com diagnóstico de câncer já ter realizado algum tipo de tratamento oncológico, ou seja, cirurgia, radioterapia e quimioterapia em quaisquer órgãos do corpo, assim como em câncer bucal.

Os pacientes com diagnóstico de câncer bucal foram examinados e as informações sobre estadiamento clínico (TNM), consumo de bebidas alcoólicas e tabaco foram coletadas em prontuário médico-odontológico. Todos esses dados foram anexados em uma ficha específica para a coleta (APÊNDICE B – Parte II).

3.2.2 Grupo controle

Foram selecionados 47 pacientes do ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT-UNESP). Os critérios de inclusão foram pacientes maiores de idade, acima dos 18 anos, que queriam participar da pesquisa. O critério de exclusão foi o paciente apresentar ou ter apresentado alguma neoplasia maligna durante sua trajetória de vida. Os pacientes também foram examinados e seus dados clínicos acerca do consumo de álcool, tabaco e comorbidades foram devidamente coletados em prontuário (APÊNDICE B - Parte I).

3.3 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico

Os pacientes foram analisados de acordo com o consumo de tabaco segundo recomendações de (Reichert et al., 2008), no qual definiu três classes de pacientes: pacientes fumantes ativos, pacientes não fumantes e pacientes ex-fumantes. Os pacientes fumantes ativos são indivíduos que fumaram aproximadamente 100 cigarros durante a vida e permaneceram com o hábito até o momento da coleta dos dados para o prontuário. Os pacientes não fumantes são aqueles que nunca fumaram ou fumaram menos de 100 cigarros durante a vida e que não tinham o hábito de consumir tabaco no momento da coleta dos dados. Enquanto os ex-fumantes são os indivíduos que fumaram durante a sua vida no mínimo 100 cigarros e que não apresentavam mais o hábito no momento da coleta após um período de 6 meses sem o hábito.

A fim de analisar o grau de dependência nicotínica foi realizado o Teste de Fagerström para Dependência à Nicotina (TFDN) (Fagerström, Ph, 2012) presente nos formulários de anamnese (APÊNDICE B - Parte III). Este teste apresenta seis questões pontuadas de acordo com a resposta e assim, de acordo com a somatória do valor de cada questão respondida, os pacientes obtiveram uma pontuação total que no máximo chegou até 10 pontos sendo alocados de acordo com as cinco categorias do Quadro 1:

Quadro 1 – Classificação do grau de dependência nicotínica segundo o teste de Fagerström (TFDN)

Grau de dependência	Pontuação do Fagerström
Muito baixa	0 a 2 pontos
Baixa	3 a 4 pontos
Moderada	5 pontos
Elevada	6 a 7 pontos
Muito elevada	8 a 10 pontos

Fonte: Adaptado de Fagerström (2012).

Com a finalidade de analisar o perfil tabágico, além do teste de Fagerström, foi realizada uma série de perguntas no prontuário referentes ao consumo do tabaco, tais como:

- a) idade de início do hábito do tabagismo;
- b) número de cigarros fumados por dia;
- c) anos de consumo do tabaco;
- d) carga tabágica.

Para a quantificação da carga tabágica, o cálculo realizado é de maços/ano por meio da seguinte fórmula (Reichert et al., 2008):

$$\text{Carga tabágica} = \frac{\text{número de cigarros fumados por dia}}{20} \times \text{anos de consumo}$$

3.4 Avaliação do perfil etílico

Os dados relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas foram arquivados em prontuário (APÊNCIDE B – Parte I). Para a quantificação do grau de consumo de álcool foi utilizada a aplicação do questionário do teste AUDIT - *Alcohol Use Disorder Identification Test* (ANEXO B) (Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011).

Este teste, AUDIT, é composto por 10 questões pontuadas separadamente e que quando somadas obtém um escore final para cada indivíduo, classificando-o de acordo com a seguinte Tabela:

Quadro 2 – Classificação do grau de risco do uso do álcool segundo o AUDIT

Grau de risco	Pontuação do AUDIT
Consumo de baixo risco	0 a 7 pontos
Uso de risco	8 a 15 pontos
Uso nocivo	16 a 19 pontos
Provável dependência	20 a 40 pontos

Fonte: Elaborado pela autora por meio das informações do artigo de Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011.

3.5 Coleta e armazenamento das amostras salivares

A coleta das amostras salivares foi realizada preferencialmente no período da manhã para que não houvesse grandes variações na sua composição. Os pacientes foram instruídos a não ingerirem quaisquer alimentos, desde líquidos, pastosos ou endurecidos por um período de 1 hora antes da coleta, bem como não realizar o consumo de bebidas alcoólicas por no mínimo 12 horas antes da coleta. Eles apenas deglutiram água e deveriam ter realizado a escovação dentária com um intervalo de pelo menos 2 horas antes do procedimento de coleta salivar.

Para a correta coleta da saliva, foi necessário que os pacientes permanecessem sentados de forma ereta, em ambiente calmo e arejado para que as condições ambientais de estresse não levassem à modificação da composição salivar. Desta forma, realizamos a coleta da saliva de forma não estimulada expelindo em um tubo plástico descartável (Falcon®, Rio de Janeiro) de acordo com o método modificado de Navazesh (Navazesh, Kumar, 2008). Os pacientes foram orientados a expelirem 3 ml de saliva nos tubos plásticos imersos em gelo, que após a coleta foram fechados hermeticamente e transportados por um período máximo de 1 hora até o seu destino de armazenagem. As amostras salivares foram armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP.

3.6 Transportes das amostras salivares

As amostras salivares foram acondicionadas e transportadas segundo o anexo da resolução CFM Nº 2.074/2014, publicada no D.O.U. de 28 de Julho de 2014, Seção I, p. 91-2, que normatiza o acondicionamento de material humano coletado para procedimentos diagnósticos a serem transportados para outra localidade que não a da sede da coleta, e também baseado nos critérios estabelecidos pela Anvisa para realização deste procedimento pelos laboratórios clínicos na seção 6.1.10 Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA/Ministério da Saúde) – RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005.

3.7 Preparo e análise metabolômica das amostras salivares

A análise do metaboloma salivar foi realizada em parceria com profissionais da área química do Laboratório Dempster de espectrometria de massas do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, USP.

A metodologia da análise do metaboloma salivar foi adaptada do estudo de Barnes et al. (2011) pela equipe de engenheiros químicos e químicos do laboratório Dempster e pela equipe de cirurgiões-dentistas da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP), que fazem parte da coorientação deste trabalho (Alves, 2016).

Inicialmente, as amostras salivares foram descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente foram secos 300 µL de cada amostra em aparelho *Speedvac*. Essa quantia de amostra salivar foi mensurada e carregada através de uma micropipeta eletrônica. Após, foram adicionados 300 µL de metanol em cada amostra e agitados em agitador do tipo vórtex por 2 segundos e novamente secos em aparelho *Speedvac*, processo de extração da amostra salivar. Após a extração, foi realizada a derivatização da amostra por meio da adição de 150 µL de partes iguais de uma solução de bistrimetilsilil-trifluoroacetamida (250 µL) e uma mistura de solventes: acetonitrila (125 µL), diclorometano (100 µL) e ciclohexano (25 µL) (v/v 5:4:1) com 5% de trietilamina (25µL) em cada *eppendorf*, homogeneizado em agitador do tipo vórtex novamente por 2 s e mantida em banho térmico a 60°C por 1 hora.

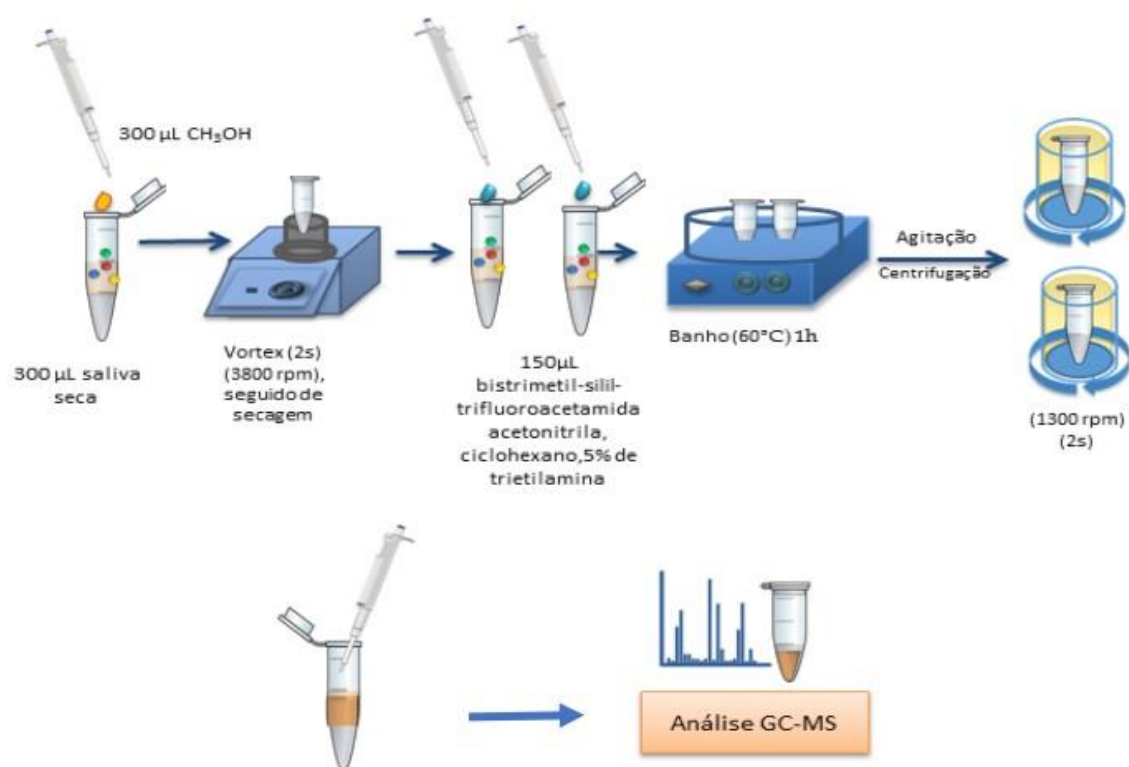
As amostras foram retiradas do banho térmico, agitadas e centrifugadas (13000 rpm por 2 s). O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro (CMS 123TAT, Brasil) transparente de 2 mL com tarja através de uma micropipeta eletrônica. Posteriormente, cerca de 2 µL da amostra foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, QP 2010Plus, Shimadzu do Brasil), coluna DB-1, 50 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 1,20 µm (Alves, 2016). Para o controle de todo o processo de extração e derivatização dos metabólitos foi adicionado um padrão interno de metionina sulfonada. O esquema da Figura 2 mostra o passo-a-passo da análise dos metabólitos.

Para que as amostras salivares já extraídas e derivatizadas pudessem ser submetidas ao GC-MS, colocamos o aparelho nas condições seguintes, de acordo com (Alves, 2016):

- a) método de análise MRM
- b) tempo de corrida: 67 minutos
- c) temperatura de injeção: 280 °C
- d) temperatura de interface: 280 °C

- e) temperatura da fonte de ionização: 200 °C
- f) taxa de aquecimento: de 100 °C até 320 °C em uma rampa linear de 4 °C/min permanecendo a essa temperatura por 8 minutos.
- g) foram corridas 3 amostras em branco antes das amostras salivares de pacientes e controle. Estas amostras continham água e o padrão interno (metionina sulfonada);
- h) foram utilizadas amostras QC (Quality Control) a cada 6 amostras salivares de pacientes e controles;
- i) foram realizadas duplicatas técnicas, ou seja, todas as amostras foram corridas duas vezes nas análises;
- j) os parâmetros de identificação dos íons se baseiam em 0,2s de tempo de retenção e 90% de íons;
- k) a base de dados utilizada foi a *smart metabolites*;
- l) o aparelho utilizado foi o triplo quadrupolo da *Shimadzu* (GCMS-TQ8040).

Figura 2 – Esquema representando todo o processo de extração e derivatização dos metabólitos das amostras salivares até sua injeção no GC-MS



Fonte: Alves, 2016.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Análise descritiva dos dados clínicos

Os dados clínicos foram analisados a partir da descrição de variáveis categóricas com contagens e proporções, foram descritas variáveis quantitativas de distribuição normal e assimétrica como média e desvio. Para consideração da normalidade, foi utilizada inspeção visual de histogramas ou aplicação de teste de normalidade (D'Agostino et al., 1990) quando adequado. Consideramos para todas as análises o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística descritiva dos dados clínicos foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism 5.03* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.8.2 Análise do perfil metabolômico

Para a análise metabolômica salivar foi construída a análise dos componentes principais (PCA) que possibilita reduzir o número de informações coletadas. Seus resultados selecionam um subconjunto de n variáveis capazes de descrever a maior parte da variabilidade dos dados. Ademais, o PCA possibilita também observar os agrupamentos, além de tendência de alocação (fracionamento), valores anômalos (*outliers*) e relações entre variáveis. O cluster *heatmap* também foi utilizado como forma de visualização dos metabólitos e agrupamento hierárquico dos compostos de cada grupo.

Para demonstrar a significância dos dados metabólicos, utilizaremos o teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Os valores de p para avaliar as diferenças nas concentrações de metabólitos entre o câncer bucal e os controles foram corrigidos pela análise de *false discover rate* (FDR) para considerar vários testes independentes no valor de $q < 0,05$ (FDR). O método para análise FDR é o de Benjamim-Hockberg (Benjamin, 1995).

A fim de identificar e ilustrar visivelmente os metabólitos que são significativos e mais expressos em cada grupo do estudo, utilizamos a ferramenta estatística designada *volcano plot*. O *volcano plot* apresenta um diagrama que permite visualizar o conjunto de metabólitos que estariam “DOWN” ou “UP” na amostra salivar. Ou seja, indica se o composto está presente com significância no grupo de pacientes controles ou no grupo câncer bucal. O *volcano plot* combina a medida de significância estatística, no caso o q-valor (FDR) com a medida de variação de magnitude FC (*Fold Change*) (Ferreti, 2015).

Com o intuito da identificação de um possível biomarcador salivar para o CCEB, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi traçada para cada metabólito. Para isso, a curva ROC utiliza os parâmetros de sensibilidade (capacidade de detectar os pacientes verdadeiros positivos, ou seja, os que realmente são doentes) e especificidade (capacidade de detectar os verdadeiros negativos, ou seja, os que não estão realmente doentes). A área sob a curva ROC, também designada de AUC (*Area Under the ROC Curve*) é capaz de discriminar se uma condição está presente ou não. Ou seja, uma AUC de 0,5 não apresenta capacidade discriminante, enquanto uma AUC de 1,0 mostra uma discriminação ideal (Hoo et al., 2017). Para o nosso estudo, consideramos AUCs acima de 0,8 como ponto ideal de corte.

Além dos testes estatísticos citados acima, realizou-se também as médias e desvio-padrão dos metabólitos de cada grupo. Para a análise dos dados metabolômicos por meio de todas as ferramentas estatísticas citadas acima foi utilizado o software *MetaboAnalyst* 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

4 RESULTADOS

4.1 Casuística das amostras

Realizamos a análise das amostras nos dois grupos de interesse: grupo de pacientes com CCEB e grupo controle. Para a análise, coletamos 86 amostras salivares no total, sendo 39 amostras do grupo CCEB e 47 amostras do grupo controle. No entanto, algumas dessas amostras foram excluídas por motivos de quantidade insuficiente de saliva e também por falta de algumas informações no prontuário. Assim, foi realizada a análise do metaboloma salivar de 27 amostras salivares do grupo CCEB e 41 amostras salivares do grupo controle.

Os principais dados sociodemográficos dos pacientes como sexo, idade e hábito de fumar foram sintetizados na Tabela 1. Ao comparar os pacientes controles com os pacientes com CCEB, nenhum desses dados demonstrou significância estatística entre as populações, ao considerar o valor de $p < 0,05$.

Tabela 1 – Perfil sociodemográfico dos pacientes da amostra

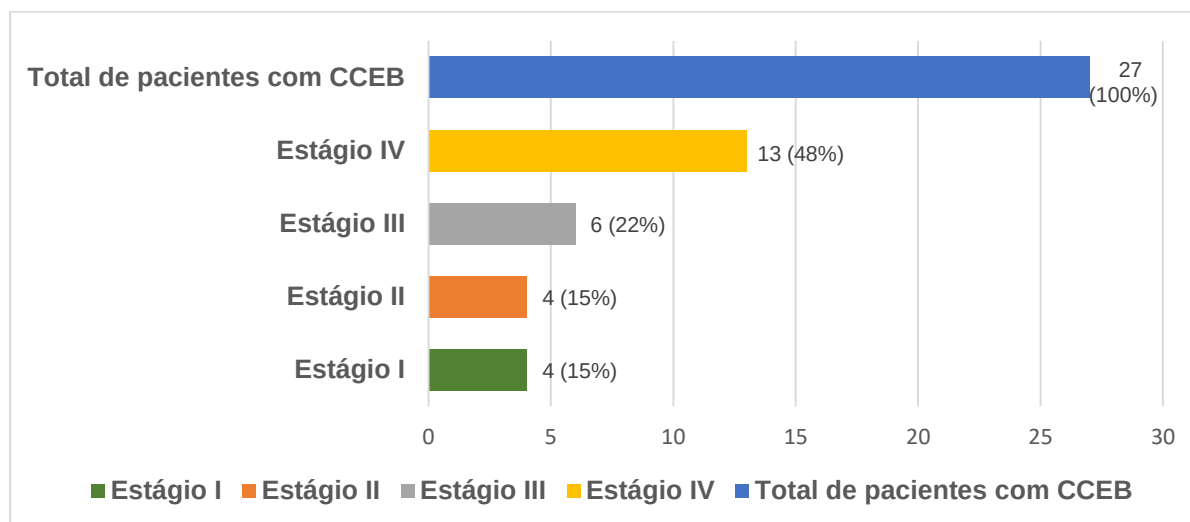
VARIÁVEIS	GRUPO CCEB (n=27)	GRUPO CONTROLE (n=41)	p-valor
Sexo			
Feminino	8 (29,6%)	20 (49%)	p=0,3326
Masculino	19 (70,4%)	21 (51%)	
Idade			
	57 ± 13,87 (28-88)	57,34 ± 11,66 (31-86)	p=0,9131
Hábito de fumar			
Fumante	10 (37%)	8 (20%)	p=0,2670
Ex-fumante	10 (37%)	13 (32%)	
Não-fumante	7 (26%)	20 (49%)	

Legenda: Idade descrita em média ± desvio padrão e entre parênteses a idade mínima e máxima dos pacientes; n representa o número de pacientes em cada grupo. As variáveis sexo e hábito de fumar estão descritas com suas respectivas médias e porcentagens (%). CCEB: carcinoma de células escamosas bucal. Valores de p de acordo com o teste t de *student* considerando significativo p<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação ao estágio da doença dos pacientes do grupo CCEB, 4 pacientes (15%) encontravam-se no estágio I e outros 4 pacientes (15%) no estágio II, considerados os estágios iniciais do câncer. A maior parte dos pacientes encontrava-se em estágios avançados, com 6 pacientes (22%) em estágio III e 13 pacientes (48%) em estágio IV (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico em barras agrupadas para a distribuição dos pacientes em relação ao estágio da doença



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2. Perfil tabágico e etílico

Os pacientes do grupo CCEB e do grupo controle foram comparados quanto às informações referentes ao perfil tabágico, considerando as seguintes variáveis:

- idade do início do hábito de fumar;
- número de cigarros fumados por dia;
- tempo de uso (em anos);
- carga tabágica (maços/ano);
- teste de Fagerström para dependência nicotínica;

No grupo CCEB, composto por amostras de saliva de 27 pacientes em sua totalidade, 10 pacientes são fumantes, 10 pacientes são ex-fumantes e 7 nunca fumaram. Assim, para as informações referentes ao perfil tabágico do grupo CCEB foi adotado um n (número da amostra) de 20 pacientes, ou seja, a junção dos pacientes

fumantes com os ex-fumantes. Para a análise do AUDIT, que mede a taxa de dependência dos pacientes ao uso do álcool, consideramos o total de 27 pacientes.

O grupo controle é composto por 41 pacientes, sendo 8 pacientes fumantes, 13 pacientes ex-fumantes e 20 pacientes que nunca fumaram. Deste modo, o n amostral de pacientes para as informações acerca do perfil tabágico deveria ser de 21 pacientes, ou seja, a junção dos pacientes fumantes com os ex-fumantes. Entretanto, apenas na análise de variável com relação ao número de cigarros fumados por dia utilizamos um n de 21 pacientes. Nas análises de variáveis tais como: idade do início do hábito de fumar, tempo de uso (anos) e carga tabágica, o n considerado foi de 20 pacientes, visto que 1 paciente não nos informou essas variáveis durante a anamnese. Para o teste de Fagerström, que mede o índice de dependência nicotínica, utilizamos o n de 8 pacientes, uma vez que este índice é utilizado apenas nos pacientes fumantes no momento da coleta dos dados.

A análise AUDIT não foi mensurada nos pacientes do grupo controle, uma vez que não havia esses dados anotados na ficha clínica dos pacientes. Os dados referentes ao perfil tabágico e etílico dos pacientes encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil tabágico e etílico dos pacientes

VARIÁVEIS	GRUPO CCEB	GRUPO CONTROLE	p-valor
Idade de início do hábito	15,45 ± 5,79 (n=20)	18,25 ± 8,67 (n=20)	p=0,6247
Número de cigarros fumados por dia	25,25 ± 13,04 (n=20)	16,43 ± 15,06 (n=21)	p=0,0185*
Tempo de uso (anos)	37,95 ± 13,15 (n=20)	26,95 ± 14,62 (n=20)	p=0,0168*
Carga tabágica (maços/ano)	45,75 ± 29,50 (n=20)	28,32 ± 33,48 (n=20)	p=0,0256*
Teste de Fagerström (TFDC)	5,6 ± 2,01 (n=10)	4,5 ± 2 (n=8)	p=0,2647
Muito baixa até moderada (0 a 5 pontos)	n=4	n=6	
Elevada até muito elevada (6 até 10 pontos)	n=6	n=2	
AUDIT (pontuação)	9,19 ± 7,25 (n=27)	Sem informação	

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão; n representa o número de amostras. CCEB: carcinoma de células escamosas bucal. Valores de p de acordo com o Teste de *Mann Whitney* quando não paramétricos e Teste de *t-student* quando paramétricos. * representa os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisar estatisticamente os dados referentes ao perfil tabágico dos pacientes, observa-se que 3 variáveis foram estatisticamente significantes entre os grupos, são estas:

- a) número de cigarros fumados por dia ($p=0,0185$);
- b) tempo de uso (anos) ($p=0,0168$);
- c) carga tabágica (maços/ano) ($p=0,0256$).

4.3 Análise metabolômica

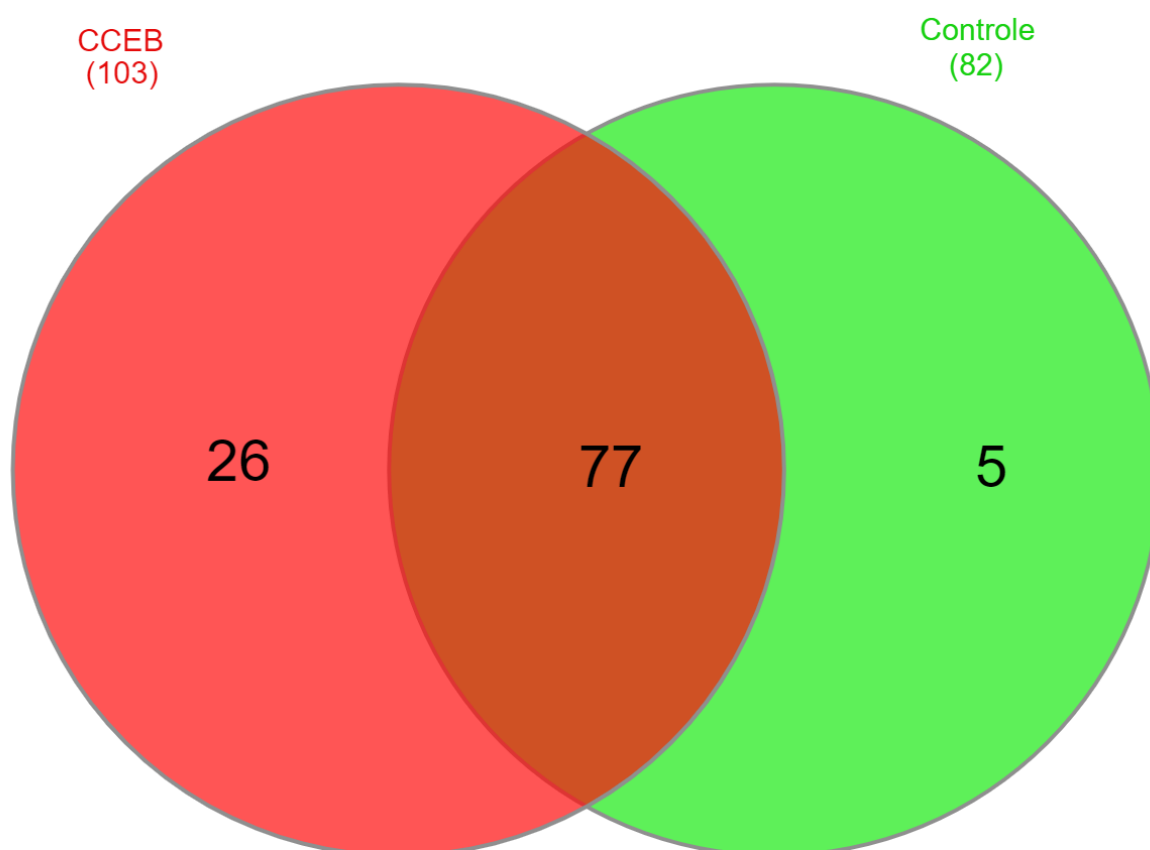
Inicialmente, após os processos de identificação dos metabólitos, um total de 282 metabólitos foram identificados. Analisando esses dados, foi observado que muitos metabólitos eram específicos para cada paciente. Assim, passamos a realizar a análise estatística abrangendo metabólitos que estivessem presentes em pelo menos 70% das amostras, em pelo menos um grupo. Desse modo, obtivemos um total de 108 metabólitos presentes nas amostras.

4.3.1 Diagrama de Venn entre o grupo CCEB e grupo controle

Todos os metabólitos encontrados em ambos os grupos de estudo, foram alocados em um diagrama de Venn para avaliarmos sua distribuição entre os grupos. Para a análise do diagrama de Venn, utilizamos o *InteractiVenn* (<http://www.interactivenn.net/>) para a geração da Figura 4 e elaboração do Quadro 3. A quantificação relativa dos metabólitos para cada grupo foi realizada a partir das áreas do cromatograma de íons totais.

Com a análise do diagrama de Venn (Figura 4) observamos que o grupo de pacientes do grupo CCEB apresentou um maior número de metabólitos específicos para o grupo, com 26 metabólitos; enquanto o grupo controle apresentou 5 metabólitos. Por outro lado, foram totalizados 77 metabólitos comuns aos dois grupos.

Figura 4 – Diagrama de Venn para os metabólitos salivares



Legenda: O grupo vermelho representa o grupo CCEB e o grupo verde representa o grupo controle.
Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *InteractiVenn*.

No Quadro 3 constam todos os metabólitos encontrados, ou seja, os 108 metabólitos identificados. A primeira coluna se refere aos 26 metabólitos encontrados somente no grupo CCEB, enquanto a segunda coluna apresenta os 5 metabólitos encontrados apenas no grupo controle e a terceira coluna refere-se aos 77 metabólitos encontrados em comum aos dois grupos.

Quadro 3 – Metabólitos salivares analisados no diagrama de Venn

(continua)

GRUPO CCEB	GRUPO CONTROLE	GRUPO CCEB + GRUPO CONTROLE
Ácido 2-hidroxiglutárico	Ácido 2-cetoadípico	1,6-anidrogucose
Ácido 2-cetoglutárico	Catecol	1-hexadecanol
Ácido 3-hidroxipropiônico	Lactose	2-aminoetanol
Ácido 4-hidroxifenilático	Leucina	2-Deoxy-glucose
Cistamina	Uréia	Ácido 2-hidroxiisovalérico
Fosfato de dihidroxiacetona		Ácido 3-aminoglutárico
Ácido galacturônico		Ácido 3-aminoisobutírico
Ácido glucônico		Ácido 3-aminopropanoico
Ácido hipúrico		Ácido 3-hidroxiisovalérico
Ácido indol-3-acético		Ácido 3-fenilático
Inosina		Ácido 4-aminobutírico
Ácido isocítrico		Ácido 5-aminovalérico
Lactitol		Ácido acetoacético
Lyxose		Adenina
Ácido málico		Allose
Maltose		Arabitol
Metionina		Ácido araquidônico
O-Fosfo-Serina		Arginina
Ácido pantotênico		Ácido aspártico
Ácido protocatecuico		Álcool batílico
Ribose 5-fosfato		Cadaverina
Sorbose		Ácido capróico
Espermidina		Ácido citramálico
Timidina		Ácido Cítrico
Uracil		Cisteína
Ácido ureidosuccínico		Dopamina
		Ácido eicosapentaenóico
		Ácido elaídico
		Frutose
		Galactosamina
		Galactose
		Glucono-1,5-lactona
		Glucosamina
		Glicose
		Ácido glucurônico
		Ácido glutâmico
		Glicerol
		Glicerol 2-fosfato

Quadro 3 – Metabólitos salivares analisados no diagrama de Venn

(conclusão)

GRUPO CCEB	GRUPO CONTROLE	GRUPO CCEB + GRUPO CONTROLE
		Glicina
		Ácido glicólico
		Hidroxilamina
		Inositol
		Isoleucina
		Ácido linoleico
		Ácido maleico
		Manitol
		Manose
		Ácido margarico
		meso-eritritol
		Sulfona de metionina
		Norepinefrina
		Octadecanol
		Octopamina
		Ácido oleico
		O-Fosfoetanolamina
		Ornitina
		Ácido palmítico
		Ácido palmitoléico
		Fenilalanina
		Ácido fosfórico
		Putrescina
		Rhamnose
		Ribitol
		Ribonolactona
		Sarcosina
		Serina
		Sorbitol
		Sacarose
		Threitol
		Ácido treônico
		Treonina
		Trealose
		Trietanolamina
		Triptamina
		Tiramina
		Tirosina
		Uridina

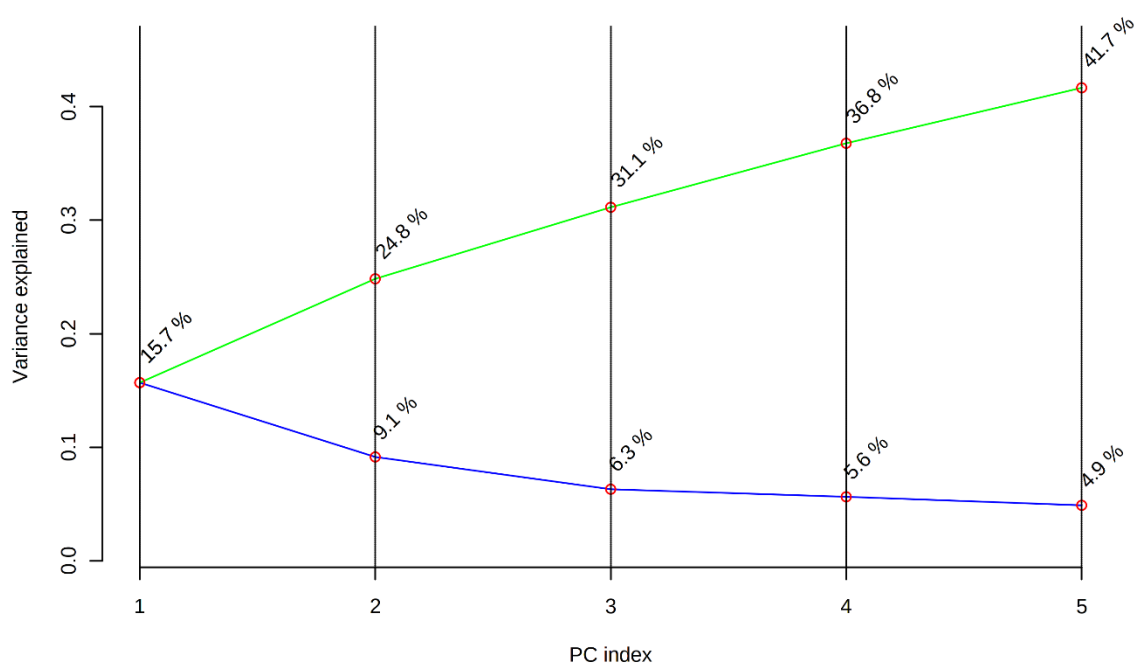
Legenda: CCEB: carcinoma de células escamosas bucal.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Análise dos componentes principais entre o grupo CCEB e grupo controle

Após a construção do diagrama de Venn, realizou-se a análise dos componentes principais (PCA) com os dois primeiros componentes explicando 24,8% da variabilidade, ou seja, a primeira componente explica 15,7% dos resultados e a segunda explica 9,1% conforme o *score plot* da análise com 5 principais componentes (Figura 5).

Figura 5 – *Score plot* com os 5 principais componentes

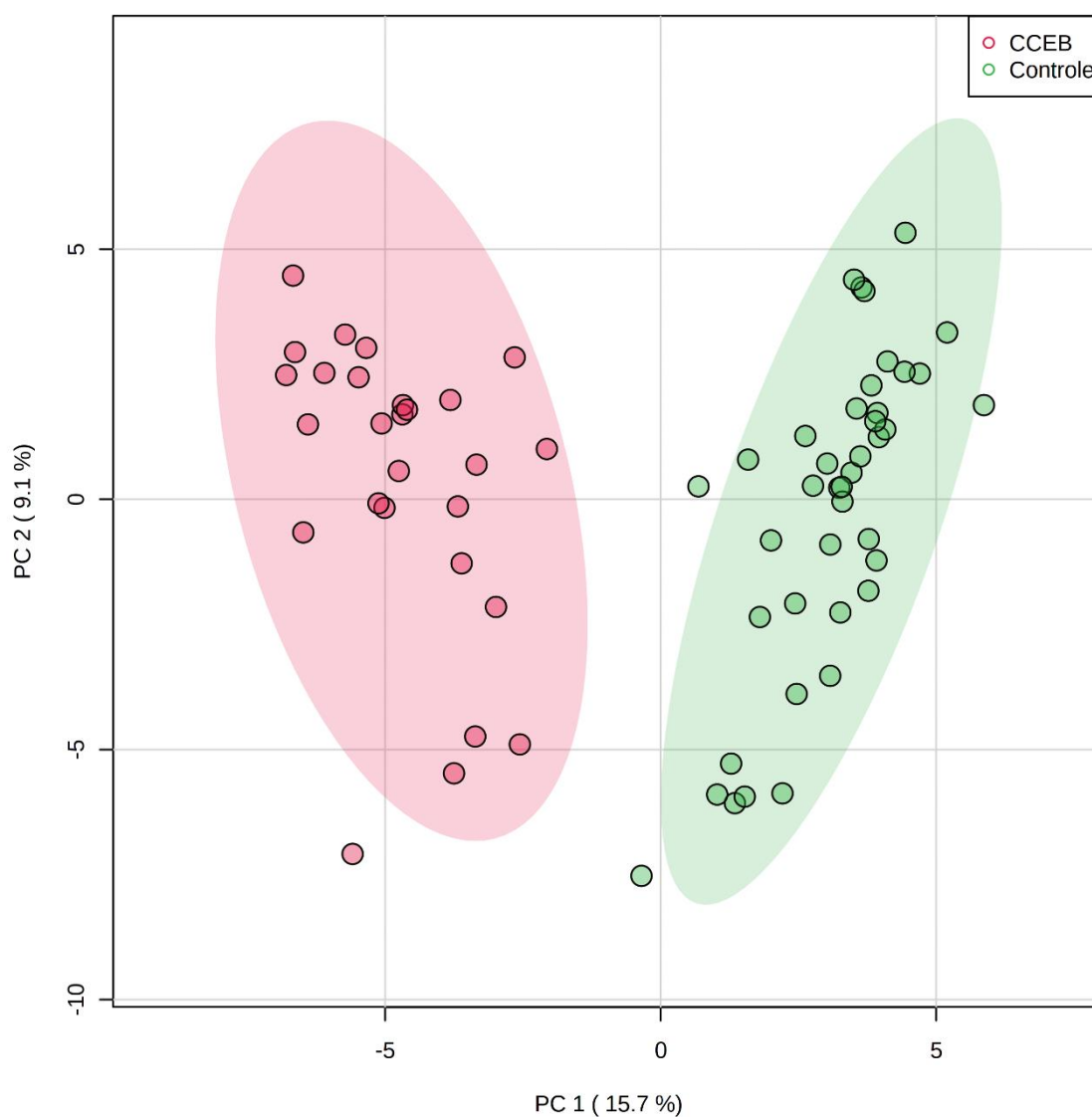


Legenda: A linha verde do *score plot* mostra os valores das componentes acumuladas e a linha azul mostra o valor de cada componente isolada.

Fonte: Elaborada pela autora por meio do *Metaboanalyst* 5.0.

Por meio da seleção das duas primeiras componentes (PC1 e PC2) é possível observar que os metabólitos do grupo com a doença conseguem formar um grupo diferente dos metabólitos dos pacientes sem a doença. Assim, todos os metabólitos identificados, os 108 metabólitos, foram utilizados para a geração do gráfico de PCA (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico do PCA entre o grupo CCEB e controle



Legenda: *Score plot* entre o PC1 e o PC2. As porcentagens que explicam as componentes estão entre parênteses.

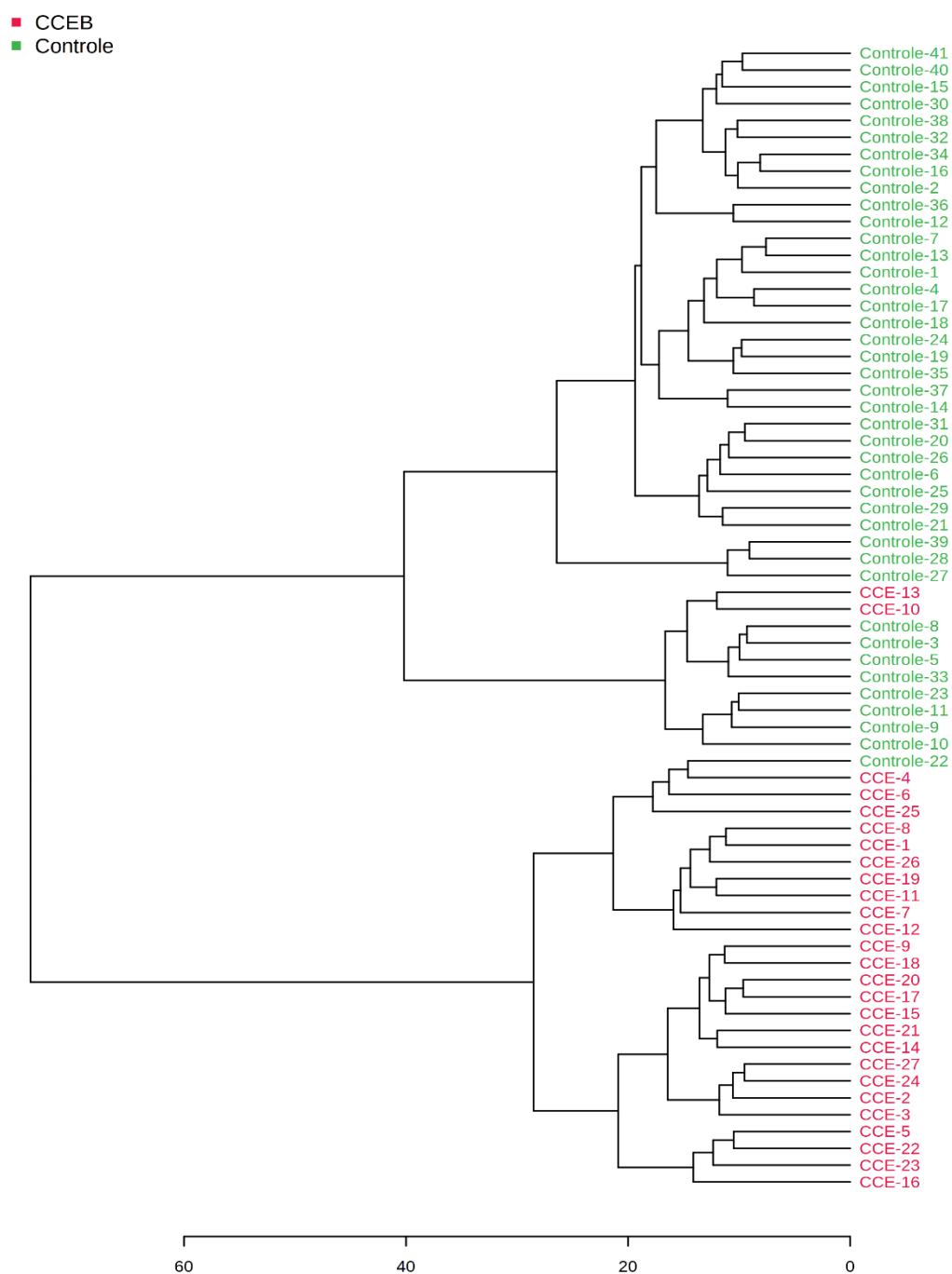
Fonte: Elaborada pela autora por meio do *Metaboanalyst* 5.0.

4.3.3 Análise de *cluster* hierárquico entre o grupo CCEB e grupo controle

A análise de cluster hierárquico envolveu a interpretação do dendrograma que foi mensurada pela medida de similaridade pela distância euclidiana e pelo parâmetro de algoritmo de agrupamento denominado ligação de Ward. Assim, quando mais

agrupados e próximos as amostras estiverem uma das outras, maior a similaridade entre elas (Figura 7).

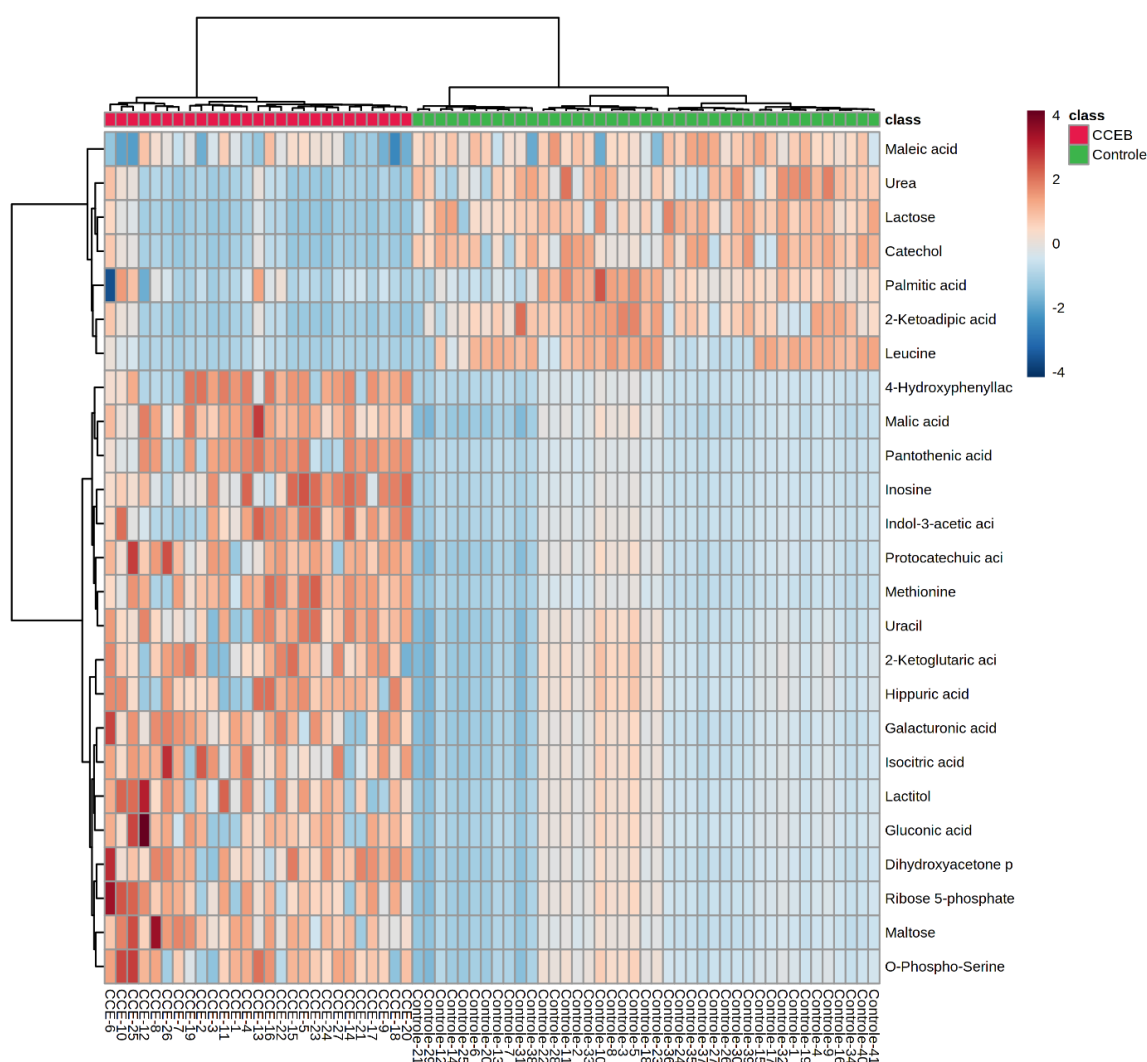
Figura 7 – Dendrograma entre grupo CCEB e grupo controle



Legenda: CCEB: grupo carcinoma de células escamosas bucal; CONTROLE: grupo controle.
 Fonte: Elaborada pela autora por meio do *Metaboanalyst* 5.0.

Construiu-se também a aquisição do *heatmap* (mapa de calor) no qual fornece uma visualização intuitiva de uma tabela de dados. No caso, cada célula colorida corresponde a uma abundância do metabólito em cada amostra salivar. Para a visualização de cluster hierárquico, utilizou-se novamente a distância euclidiana e o algoritmo ligação de Ward. É possível visualizar no *heatmap* que os grupos apresentam metabólitos estatisticamente significantes diferentes em cada grupo e que obtiveram uma separação (Figura 8).

Figura 8 – *Heatmap* entre o grupo CCEB e o grupo controle demonstrando metabólitos diferentemente regulados



Legenda: CCEB: grupo carcinoma de células escamosas. CONTROLE: grupo controle. Quanto mais intenso o vermelho nas células, maior a concentração do metabólito na amostra salivar de acordo com o teste T (FDR) com $q < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst 5.0*.

4.3.4 Análise dos metabólitos significantes entre o grupo CCEB e grupo controle

Utilizando-se o *Metaboanalyst* 5.0, buscamos os metabólitos estatisticamente significantes entre os grupos CCEB e controle. Para tanto, o p-valor foi calculado, assim como o valor de q-value (FDR) com $q < 0,05$. As médias e desvio padrão dos metabólitos estatisticamente significativos ($q < 0,05$) são descritos na Tabela 3.

A fim de especificar os metabólitos que aparecem em maior concentração em cada grupo de interesse, foi construída a análise estatística do *volcano-plot*, que é uma combinação do *Fold Chance* (FC) com o q-valor (FDR). Assim, por meio da análise do *volcano-plot*, é possível discriminar em qual grupo os metabólitos estão em maior quantidade. Na Tabela 3, os metabólitos que apresentam a palavra *UP* estão expressos em maior quantidade nas amostras salivares do grupo CCEB, enquanto a palavra *DOWN* expressa que estão em menor quantidade nas amostras de CCEB e em maior quantidade nas amostras dos pacientes do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Metabólitos que demonstraram diferença estatística entre os grupos

(continua)

Metabólitos	CCEB		Controle		p-valor ¹	q-valor (FDR) ²	FC	Volcano plot
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão				
Lactose	-1,090	0,492	0,718	0,673	<0,0001	3,1755E-16	0,015832	Down
Ácido málico	0,917	0,622	-0,604	0,444	<0,0001	3,7012E-16	40,712	Up
Metionina	1,088	0,939	-0,717	0,367	<0,0001	3,0633E-15	311,66	Up
Catecol	-0,952	0,521	0,627	0,734	<0,0001	7,1635E-13	0,035587	Down
Ácido 2-cetoadípico	-0,925	0,522	0,609	0,768	<0,0001	6,363E-12	0,029706	Down
Maltose	0,889	0,959	-0,586	0,407	<0,0001	2,0868E-11	325,18	Up
Ácido protocatecuico	0,806	0,827	-0,531	0,447	<0,0001	2,7666E-11	35,723	Up
Leucina	-1,177	0,394	0,775	1,173	<0,0001	8,7168E-11	8,2595E-4	Down
Inosina	1,070	1,317	-0,704	0,330	<0,0001	9,7882E-11	2873,0	Up
Ácido pantotênico	1,153	1,459	-0,759	0,304	<0,0001	1,4172E-10	4271,4	Up
Ureia	-0,861	0,530	0,567	0,810	<0,0001	1,687E-10	0,037894	Down
Fosfato de diidroxiacetona	0,793	0,895	-0,522	0,439	<0,0001	1,687E-10	45,791	Up
Ácido 4-hidroxifenilático	1,092	1,403	-0,719	0,318	<0,0001	2,1476E-10	2173,8	Up

Tabela 3 – Tabela com os metabólitos estatisticamente significativos

(conclusão)

Metabólitos	CCEB		Controle		p-valor ¹	q-valor (FDR) ²	FC	Volcano plot
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão				
Ácido galacturônico	0,725	0,831	-0,477	0,467	<0,0001	8.9307E-10	19.383	Up
Ácido indol-3-acético	0,906	1,242	-0,597	0,365	<0,0001	3.0805E-9	341,04	Up
Uracil	0,644	0,817	-0,424	0,491	<0,0001	3.04E-8	10,819	Up
Ácido isocítrico	0,665	0,885	-0,438	0,472	<0,0001	3,6657E-8	20,802	Up
Ribose-5-fosfato	0,647	0,969	-0,469	0,461	<0,0001	3.1666E-7	41.912	Up
O-Fosfo-Serina	0,609	0,945	-0,401	0,474	<0,0001	9.548E-7	17.64	Up
Lactitol	0,630	1,061	-0,415	0,446	<0,0001	2.1547E-6	41.538	Up
Ácido glucônico	0,609	1,101	-0,401	0,443	<0,0001	7.7433E-6	183.99	Up
Ácido 2-cetoglutarico	0,515	0,836	-0,339	0,512	<0,0001	1.3092E-5	6,7421	Up
Ácido hipúrico	0,518	0,888	-0,341	0,506	<0,0001	1.4925E-5	7.3906	Up
Ácido maleico	-0,664	1,049	0,437	0,817	<0,0001	3.294E-5	0,18093	Down
Ácido palmítico	-0,430	0,657	0,283	0,551	<0,0001	3.3213E-5	0,38165	Down
Ácido 3-hidroxipropiônico	0,608	1,265	-0,400	0,411	0,0002	4.4319E-5	202,32	Up
Espermidina	0,481	0,887	-0,317	0,514	0,0001	5.3374E-5	10.562	Up
Ornitina	-0,614	1,197	0,405	0,986	0,0003	0,0010593	0,33872	Down
Ácido margarico	-0,453	1,055	0,298	0,648	<0,0001	0,0018846	0,28057	Down
Sacarose	-0,487	1,005	0,321	0,928	0,0002	0,0039383	0,25406	Down
Octadecanol	-0,310	0,666	0,204	0,628	0,0010	0,0064518	0,56165	Down
Threitol	-0,465	1,148	0,307	0,847	0,0012	0,0069549	0,37775	Down
Ácido acetoacético	-0,373	0,732	0,246	0,826	0,0024	0,0074047	0,25319	Down
Sulfona de metionina	-0,306	0,767	0,202	0,582	0,0001	0,0085698	1.123	Down
Ácido fosfórico	-0,374	0,806	0,246	0,968	0,0103	0,022159	0,12317	Down
Ácido eláidico	-0,254	0,578	0,167	0,722	0,0134	0,038044	0,4826	Down
Manose	-0,398	1,309	0,262	0,881	0,0324	0,042273	0.51969	Down
Sorbitol	-0,361	0,890	0,238	1,048	0,0173	0,046325	0,11612	Down
Ácido cítrico	-0,416	1,200	0,274	1,111	0,0369	0,046725	0,11946	Down
Ácido 3-aminopropanoico	-0,324	0,895	0,213	0,907	0,0004	0,048905	0,39703	Down

Legenda: CCEB: grupo carcinoma de células escamosas bucal. CONTROLE: grupo controle. ¹p-valor foi calculado a partir do teste Wilcoxon-Mann-Whitney (p-valor <0,05).² Todos os metabólitos apresentados na Tabela foram estatisticamente significativos com FDR de 5% (FDR<0,05). Os metabólitos destacados em verde são os metabólitos exclusivamente encontrados nos pacientes controle. Enquanto os metabólicos destacados em amarelo são os exclusivamente encontrados nos pacientes com CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst 5.0*.

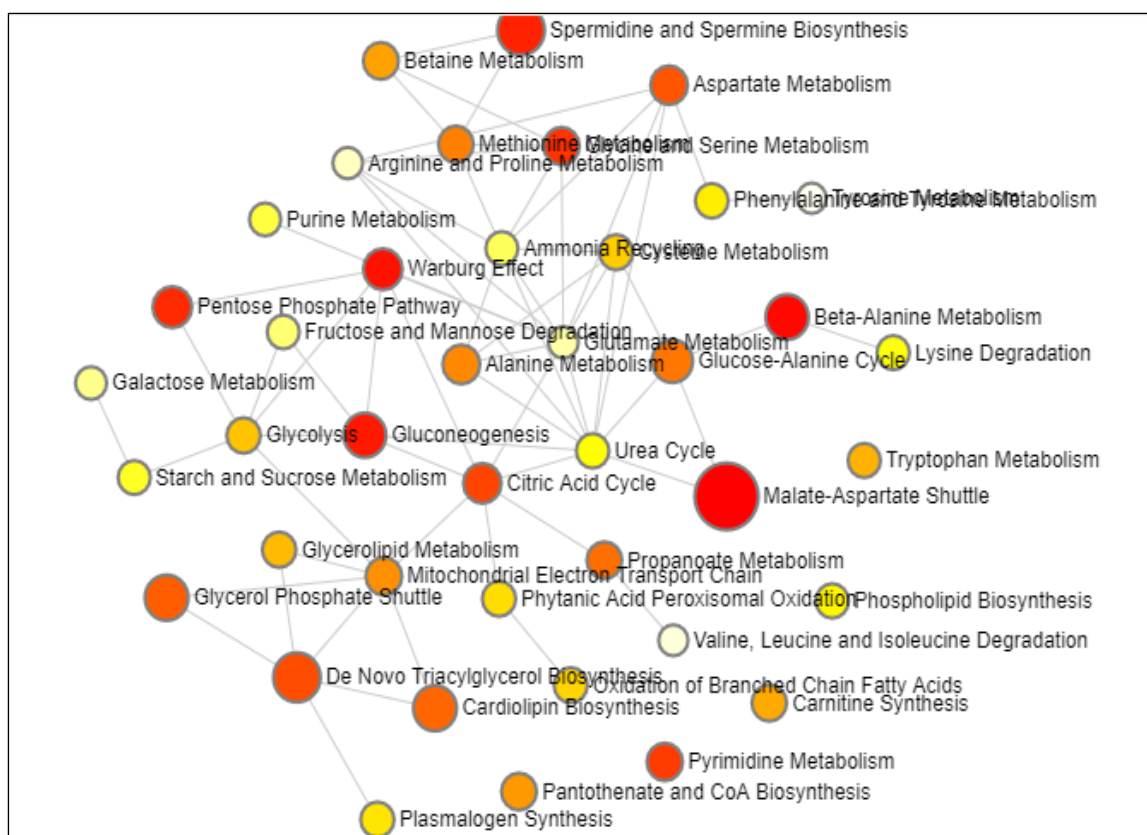
Ao todo, foram estatisticamente significativos entre os dois grupos, 40 metabólitos, incluindo os metabólitos específicos de cada grupo, conforme demonstrado na Tabela 3. Dentre eles, 20 metabólitos encontram-se mais concentrados no grupo CCEB (ácido málico, metionina, maltose, ácido protocatecuico, inosina, ácido pantotênico, fosfato de diidroxiacetona, ácido 4-hidroxifenilático, ácido galacturônico, ácido indol-3-acético, uracil, ácido isocítrico, ribose-5-fosfato, o-fosfo-serina, lactitol, ácido glucônico, ácido hipúrico, ácido 3-hidroxipropiônico e espermidina) e 20 encontram-se mais concentrados no grupo controle (lactose, catecol, ácido 2-cetoadípico, leucina, ureia, ácido maleico, ácido palmítico, ornitina, ácido margarico, sacarose, octadecanol, threitol, ácido acetoacético, sulfona de metionina, ácido fosfórico, ácido elaídico, manose, sorbitol, ácido cítrico, ácido 3-aminopropanoico).

4.3.5 Análise das vias metabólicas alteradas no grupo CCEB

As análises construídas nos tópicos anteriores nos permitiu estudar mais profundamente as vias metabólicas que apresentam alterações nos pacientes com CCEB a fim de futuramente investigar o papel de cada metabólito nessas vias e assim contribuir para pesquisas com metabolômica direcionada.

Portanto, para estabelecer as vias alteradas do grupo CCEB, utilizamos a lista dos 26 metabólitos encontrados apenas no grupo com a doença conforme já descrito no item 4.3.1 deste trabalho. Utilizamos a plataforma de código aberto *Metaboanalyst* 5.0 para obter as vias desreguladas conforme a Figura 9.

Figura 9 – Principais vias metabólicas alteradas nos pacientes com CCEB



Legenda: A Figura 9 mostra a rede de vias alteradas nos pacientes com CCEB. Os nós representam as vias alteradas e dentro de cada nó está o conjunto de metabólitos enriquecidos.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto *Metaboanalyst 5.0*

Na plataforma do Metaboanalyst, inicialmente há uma padronização dos nomes dos compostos para que seja eficaz a busca dos metabólitos nas principais bases de dados utilizadas, como a KEGG pathway (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e SMPDB (*Small Molecule Pathway Database*). Assim, os 25 metabólitos que estavam selecionados foram identificados com outros nomes padrões ilustrados na Figura 10 na coluna denominada “HIT”. Apenas 1 metabólito, a *Cystamine*, não foi identificado nas duas bases de dados de compostos metabolômicos, sendo portanto excluída da análise (Figura 10).

Figura 10 – Padronização dos nomes dos metabólitos

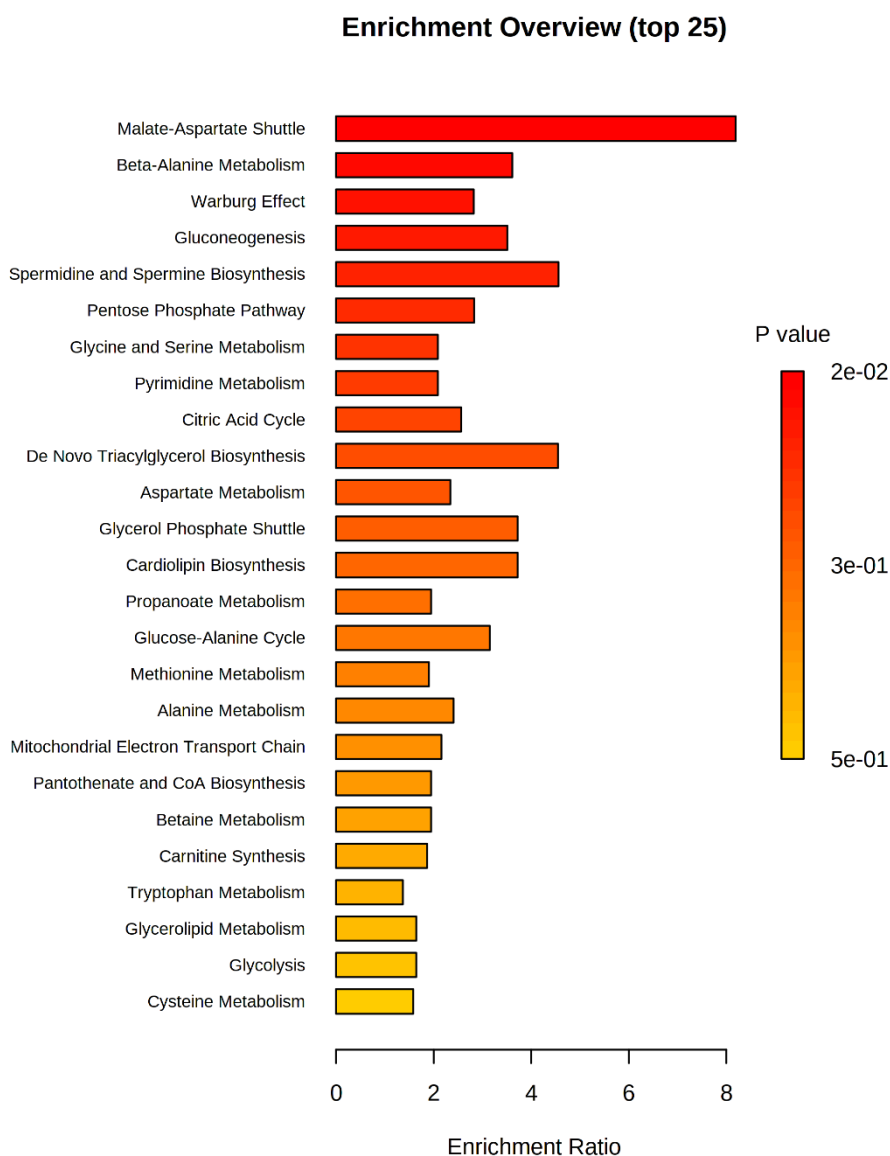
Query	Hit
2-Hydroxyglutaric acid	4-Amino-5-aminomethyl-2-methylpyrimidine
2-Ketoglutaric acid	Oxoglutaric acid
3-Hydroxypropionic acid	Hydroxypropionic acid
4-Hydroxyphenyllactic acid	Hydroxyphenyllactic acid
Cystamine	
Dihydroxyacetone phosphate	Dihydroxyacetone phosphate
Galacturonic acid	Galacturonic acid
Gluconic acid	Gluconic acid
Hippuric acid	Hippuric acid
Indol-3-acetic acid	Indoleacetic acid
Inosine	Inosine
Isocitric acid	Isocitric acid
Lactitol	Galactitol
Lyxose	Pectin
Malic acid	Malic acid
Maltose	D-Maltose
Methionine	L-Methionine
O-Phospho-Serine	Phosphoserine
Pantothenic acid	Pantothenic acid
Protocatechuic acid	Protocatechuic acid
Ribose 5-phosphate	D-Ribose 5-phosphate
Sorbose	L-Sorbose
Spermidine	Spermidine
Thymidine	Thymidine
Uracil	Uracil
Ureidosuccinic acid	Ureidosuccinic acid

Legenda: A coluna “Query” refere-se ao nome dos metabólitos que foram colocados na plataforma, enquanto a coluna “HIT” refere-se aos nomes padronizados pelo metaboanalyst para que a busca nas bases de dados KEGG e HMDB ocorressem. O metabólito destacado em amarelo indica que o composto não pode ser encontrado nas principais bases de dados sendo, portanto, excluído da análise de enriquecimento de vias.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

Além da forma de visualização em formato de rede metabólica, as vias metabólicas afetadas podem ser observadas em forma de gráfico em barra conforme a Figura 11. Dessa forma, as barras horizontais representam as vias metabólicas mais significantes de modo que quanto mais vermelha a barra, o p-valor da via é mais significativo. Desse modo, barras horizontais de coloração mais alaranjada e amarelada são vias menos significantes para as amostras. E quanto mais longas as barras, maior o valor de enriquecimento da amostra. A taxa de enriquecimento (*enrichment ratio*) é calculada por acertos/ esperados, em que acertos são ocorrências observadas, e esperadas são as ocorrências que podem acontecer. (Figura 11).

Figura 11 – Gráfico em barras representando as vias metabólicas mais significantes do grupo CCEB



Legenda: Principais 25 vias metabólicas afetadas pela doença. Quanto mais intenso o tom de vermelho, menor o valor de p, ou seja, mais significativa é a via.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

Para a melhor visualização das vias envolvidas e dos metabólitos que estão presentes nessa via e que se mostram alterados nas amostras de CCEB, foi construída a Tabela 4 com o nome das vias, o p-valor da via, os metabólitos que envolvem a via e as referências das bases de dados. Assim, na coluna dos metabólitos

que fazem da parte da via, os metabólitos escritos em vermelho representam os metabólitos que foram descritos nas amostras salivares dos pacientes com câncer bucal, a partir destes metabólitos destacados, é que conclui-se que determinadas vias encontram-se alteradas (Tabela 4).

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continua)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Malato-aspartato	0,0229	Ácido L-glutâmico; Ácido L-aspártico; Ácido oxoglutárico ; Ácido oxalacético; Cálcio; Ácido málico ; NAD; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Íon de hidrogênio	SMPDB
Metabolismo de beta-alanina	0,0467	1,3-diaminopropano; Ácido ureidopropiônico; Carnosina; Amônia; Beta-alanina; Dihidrouracil; Ácido L-glutâmico; L-histidina; Ácido L-aspártico; Anserine; Ácido oxoglutárico ; Ácido pantotênico ; NADP; NADPH; Uracil ; Cálcio; 3-metil-histidina; Cobre; NAD; 3-aminopropionaldeído; Acetil-CoA; MANIA; Íon zinco (II); Oxigênio; Coenzima A; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Flavin Mononucleotide; Dióxido de carbono; Água; Peróxido de hidrogênio; Semialdeído malônico; Topaquinone; Íon de hidrogênio	SMPDB
Efeito Warburg	0,048	Biotina; Amônia; Ácido Cítrico; D-glicose; Frutose 6-fosfato; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; Ácido L-málico; Ácido L-láctico; Ácido isocítrico ; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Ácido succínico; Ácido fosfoenolpirúvico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Potássio; Carbonato de hidrogênio; 5-fosfato de D-Ribulose; L-Glutamina; Ácido 3-fosfoglicérico; 5-fosfato de xilulose; NAD; Lipoamida; Succinil-CoA; Frutose 1,6-bisfosfato; D-Sedoheptulose 7-fosfato; Coenzima Q10; D-Gliceraldeído 3-fosfato; 6-Fosfonoglucono-D-lactona; FADH; Difosfato de guanosina; Acetil-CoA; MANIA; 1,3-bisfosfato de ácido glicérico; Trifosfato de guanosina; Ácido 6-fosfogluconico; D-eritrose 4-fosfato; Manganês; ADP; Hidrogênio; Pirofosfato de tiamina; Glicose 6-fosfato; Coenzima A; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; D-Ribose 5-fosfato ; Dióxido de carbono; Água; Ácido fosfórico; Ácido 2-fosfo-D-glicérico; Beta-D-glicose 6-fosfato; Íon de hidrogênio; QH (2)	SMPDB

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Gliconeogênese	0,0502	Biotina; D-glicose; Frutose 6-fosfato; Ácido L-láctico; Ácido oxoglutárico ; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Ácido fosfoenolpirúvico; Beta-D-Glucose; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Carbonato de hidrogênio; Ácido málico ; Ácido 3-fosfoglicérico; NAD; Frutose 1,6-bisfosfato; D-Gliceraldeído 3-fosfato; Difosfato de guanosina; 1,3-bisfosfato de ácido glicérico; Trifosfato de guanosina; Ácido 2,3-difosfoglicérico; Manganês; ADP; Glicose 6-fosfato; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Glicose 1-fosfato; Dióxido de carbono; Água; Ácido fosfórico; Alfa-D-glicose; Ácido 2-fosfo-D-glicérico; Beta-D-glicose 6-fosfato; Íon de hidrogênio	SMPDB KEGG
Biossíntese de espermidina e espermina	0,069	Ornitina; Pirofosfato; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Potássio; L-metionina ; S-adenosilmetioninamina; Piruvaldeído; 5'-metiltioadenosina; S-adenosilmetionina; Espermina; Espermidina ; Putrescina; Fosfato; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Água; Íon de hidrogênio	SMPDB
Via da Pentose Fosfato	0,156	Monofosfato de adenosina; Frutose 6-fosfato; Gluconolactona; NADP; NADPH; Fosforibosilpirofosfato; D-Ribose; Trifosfato de adenosina; Magnésio; 5-fosfato de D-Ribulose; Fe ²⁺ ; 5-fosfato de xilulose; Acetaldeído; Desoxirribose 5-fosfato; Frutose 1,6-bisfosfato; D-Sedoheptulose 7-fosfato; D-Gliceraldeído 3-fosfato; Ácido 6-fosfoglicônico; D-eritrose 4-fosfato; ADP; Desoxirribose 1-fosfato; Glicose 6-fosfato; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; Ribose 1-fosfato; D-Ribose 5-fosfato ; Dióxido de carbono; Água; Beta-D-Glicose 6-fosfato	SMPDB KEGG
Metabolismo da glicina e serina	0,17	Ácido 2-cetobutírico; Betaína; Monofosfato de adenosina; Amônia; Creatina; Dimetilglicina; L-cistationina; Ácido glioxílico; Glicina; Ácido guanidoacético; Ácido glicérico; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; L-treonina; L-serina; Ácido oxoglutárico ; Ornitina; Ácido orotidílico; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Sarcosine; Fosfoserina ; L-Arginina; Trifosfato de adenosina; Magnésio; L-cisteína; L-Metionina ; Homocisteína; Ácido 3-fosfoglicérico; NAD; S-adenosil-homocisteína; Succinil-CoA; Ácido fosfohidroxipirúvico; Ácido 5-aminolevulínico; Piruvaldeído; S-adenosilmetionina; Acetil-CoA; MANIA; Íon zinco (II); ADP; Ácido hidroxipirúvico; Oxigênio; Coenzima A; Formaldeído; Fosfato; Ácido (R) -lipóico; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; 5,10-Metileno-THF; Ácido tetrahidrofólico; Dióxido de carbono; Água; Aminoacetona; Peróxido de hidrogênio; D-Serina; Ácido L-2-amino-3-oxobutanóico; Diidrolipoato; Ácido 8 - [(Aminometil) sulfanil] -6-sulfaniloctanóico; Ácido (S) -lipoico	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo da pirimidina	0,17	Desoxiuridina; Desoxicitidina; Ácido ureidopropiônico; Amônia; Beta-alanina; Dihidrouracil; Dihidrotimina; Trifosfato de citidina; Citidina; Monofosfato de citidina; NADP; Ácido orotidílico; NADPH; Ácido orótico; Pirofosfato; Timina; Timidina ; Fosforibosilpirofosfato; Trifosfato de uridina; 5'-monofosfato de uridina; 5'-difosfato de uridina; Uridina; Uracil ; Cálcio; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Carbonato de hidrogênio; L-Glutamina; Fe ²⁺ ; Ácido ureidosuccínico ; dCTP; dUDP; Ácido diidrotróico; Fosfato de carbamoilo; Trifosfato de desoxiuridina; dCMP; Ácido 5-timidílico; dCDP; MANIA; dTDP; Íon zinco (II); ADP; 5'-trifosfato de timidina; Desoxirribose 1-fosfato; dUMP; Fosfato; Ribose 1-fosfato; Flavina Mononucleotida; 5,10-Metileno-THF; CDP; Dióxido de carbono; Ácido ureidoisobutírico; Água; Ácido fosfórico; Ácido L-diidroorótico; Quinone; 3'-AMP; Ácido 3-aminoisobutanóico; Zinco	SMPDB KEGG
Ciclo do ácido cítrico	0,182	Biotina; ácido cis-Aconítico; Ácido Cítrico; Ácido fumárico; Ácido L-málico; Ácido isocítrico ; Ácido oxoglutarico ; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Ácido succínico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Carbonato de hidrogênio; NAD; Lipoamida; Succinil-CoA; Coenzima Q10; FADH; Difosfato de guanosina; Acetil-CoA; MANIA; Trifosfato de guanosina; Manganês; ADP; Pirofosfato de tiamina; Coenzima A; Fosfato; NADH; Dióxido de carbono; Água; Íon de hidrogênio; QH (2)	SMPDB KEGG
Biossíntese de Triacilglicerol	0,2	3-fosfato de glicerol; Magnésio; NAD; Coenzima A; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Água; Íon de hidrogênio	SMPDB
Metabolismo de aspartato	0,209	Ácido acético; Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido argininosuccínico; Beta-alanina; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; L-Asparagina; Ácido inosínico; Ácido L-aspartico; Ácido oxoglutarico ; Ácido oxalacético; Pirofosfato; L-Arginina; Ácido adenilsuccínico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; L-Glutamina; Ácido malônico; Ácido N-acetil-L-aspartico; Ácido ureidosuccínico ; Citrulina; Fosfato de carbamoilo; Difosfato de guanosina; MANIA; Trifosfato de guanosina; Íon zinco (II); Oxigênio; Fosfato; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Água; Peróxido de hidrogênio; Ácido D-aspartico; Semialdeído Malônico	SMPDB KEGG
Transporte de fosfato de glicerol	0,239	3-fosfato de glicerol; NAD; D-Gliceraldeído 3-fosfato; FADH; MANIA; 1,3-bifosfato de ácido glicérico; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Ácido fosfórico; Hidroquinona; Quinone	SMPDB

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Biossíntese de Cardiolipina	0,239	Trifosfato de citidina; Monofosfato de citidina; 3-fosfato de glicerol; Pirofosfato; NAD; Coenzima A; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Água; Íon de hidrogênio	SMPDB
Ciclo de glicose-alanina	0,276	Amônia; D-glicose; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Ácido pirúvico; NAD; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Água; Íon de hidrogênio	SMPDB
Metabolismo da Metionina	0,283	Ácido 2-cetobutírico; Betaína; Monofosfato de adenosina; Adenosina; Amônia; Dimetilglicina; Colina; L-cistationina; Glicina; L-serina; Pirofosfato; Sarcosine; Trifosfato de adenosina; Magnésio; L-cisteína; Potássio; L-metionina ; L-homoserina; Homocisteína; NAD; S-adenosil-homocisteína; 1-fosfato de 5-metiltioribose; 10-Formyltetrahydrofolate; S-adenosilmetioninamina; 5'-metiltioadenosina; MANIA; Espermidina ; Íon zinco (II); Oxigênio; Ácido 5-metiltetrahidrofólico; Putrescina; Fosfato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; 5,10-Metileno-THF; Ácido 2-oxo-4-metiltiobutanóico; Ácido tetrahidrofólico; Dióxido de carbono; Sulfóxido de metionina; Água; Peróxido de hidrogênio; Zinco	SMPDB KEGG
Metabolismo de Alanina	0,345	Biotina; Monofosfato de adenosina; Ácido glicólico; Glicina; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; Ácido oxoglutárico ; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Trifosfato de adenosina; Carbonato de hidrogênio; Íon zinco (II); Manganês; ADP; Fosfato; Piridoxal 5'-fosfato	SMPDB KEGG
Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	0,377	3-fosfato de glicerol; Ácido fumárico; Ácido succínico; Trifosfato de adenosina; NAD; Ubiquinol 8; Coenzima Q10; D-Gliceraldeído 3-fosfato; MANIA; 1,3-bifosfato de ácido glicérico; ADP; Hidrogênio; Oxigênio; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Água; Heme; Íon de hidrogênio	SMPDB
Pantotenato e Biossíntese de CoA	0,408	Monofosfato de adenosina; Trifosfato de citidina; Monofosfato de citidina; Ácido pantotênico ; Pirofosfato; Cálcio; Trifosfato de adenosina; L-cisteína; D-4'-Fosfopantotenato; 4-fosfopantotenoilcisteína; ADP; Dephospho-CoA; Panteína 4'-fosfato; Coenzima A; Flavin Mononucleotide; Dióxido de carbono; Água; Cisteamina; Pantetheine; Pantotenol; D-Pantotenoil-L-cisteína	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo da betaína	0,408	Betaína; Adenosina; Dimetilglicina; Colina; Pirofosfato; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Potássio; L-metionina ; Homocisteína; NAD; S-adenosilhomocisteína; S-adenosilmetionina; MANIA; Betaína aldeído; Íon zinco (II); Ácido 5-metiltetrahidrofólico; Fosfato; NADH; Ácido tetrahidrofólico; Água	SMPDB
Síntese de Carnitina	0,423	Ácido ascórbico; L-Carnitina; Glicina; L-lisina; Ácido oxoglutárico ; Ácido succínico; Fe ²⁺ ; NAD; S-adenosilhomocisteína; Ácido 4-trimetilamóniobutanóico; S-adenosilmetionina; N ⁶ , N ⁶ , N ⁶ -Trimetil-L-lisina; 4-trimetilamóniobutanol; Hidrogênio; Oxigênio; 3-hidroxi-N ⁶ , N ⁶ , N ⁶ -trimetil-L-lisina; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Água; D-lisina; Íon de hidrogênio	SMPDB
Metabolismo do triptofano	0,437	Tetraidrobiopterina; Ácido fórmico; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; Ácido indolacético ; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Ácido quinolínico; Pirofosfato; Serotonina; Triptamina; 5-hidroxi-L-triptofano; Trifosfato de adenosina; L-quinurenina; Fe ²⁺ ; Ácido quinurênico; Ácido 5-hidroxiindolacético; Ácido xanturênico; NAD; L-triptofano; S-adenosilhomocisteína; Ácido 4- (2-aminofenil) -2,4-dioxobutanóico; Ácido 2-aminobenzóico; S-adenosilmetionina; Indolacetaldeído; N'-Formilquinurenina; Acetil-CoA; N-acetilserotonina; MANIA; Semialdeído de ácido 2-aminomucônico; Semialdeído de ácido 2-amino-3-carboximucônico; Oxigênio; Melatonina; Coenzima A; Ácido 3-hidroxiantrânico; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Água; Molibdopterina; 4a-hidroxitetra-hidrobiopterina; Peróxido de hidrogênio; Heme; 3'-AMP; 5-hidroxiindolacetaldeído; 5-hidroxicinurenina; 4,6-Dihidroxiquinolina; Cinnavalinate; 6-hidroximelatonina; Ácido 4- (2-amino-3-hidroxifenil) -2,4-dioxobutanóico; 5-hidroxi-N-formilquinurenina; Ácido formilantrânico; 5-metoxiindolacetato; Acetil-N-formil-5-metoxiquinurenina; N-Metilserotonina; N-metiltriptamina; L-3-hidroxicinurenina; 5-hidroxicinurenina; Formil-5-hidroxiquinurenina	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo glicerolípídico	0,465	3-fosfato de glicerol; Glicerol; Ácido glicérico; NADP; Ácido palmítico; NADPH; Trifosfato de adenosina; PA (16: 0/16: 0); Ácido 3-fosfoglicérico; NAD; Gliceraldeído; MANIA; Palmitil-CoA; ADP; Coenzima A; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Água; Hidroquinona; Quinone; TG (16: 0/16: 0/16: 0); DG (16: 0/16: 0/0: 0); LysoPA (16: 0/0: 0); MG (0: 0/16: 0/0: 0)	SMPDB KEGG
Glicolise	0,465	D-glicose; Frutose 6-fosfato; Ácido pirúvico; Ácido fosfoenolpirúvico; Beta-D-Glucose; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Potássio; Ácido 3-fosfoglicérico; NAD; Frutose 1,6-bisfosfato; D-Gliceraldeído 3-fosfato; 1,3-bifosfato de ácido glicérico; Ácido 2,3-difosfoglicérico; ADP; Glicose 6-fosfato; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Glicose 1-fosfato; Água; Ácido fosfórico; Alfa-D-glicose; Ácido 2-fosfo-D-glicérico; Beta-D-Glicose 6-fosfato	SMPDB KEGG
Metabolismo da cisteína	0,478	Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido L-glutâmico; Ácido oxoglutárico ; Sulfito; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Trifosfato de adenosina; L-cisteína; Fe ²⁺ ; NAD; 3-sulfinoalanina; gama-glutamilcisteína; Íon zinco (II); ADP; Ácido 3-mercaptopirúvico; Oxigênio; Ácido 3-sulfilpirúvico; Tiocianato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Cianeto; Água; Ácido 3-mercaptoplático; Ácido fosfórico; Sulfato de hidrogênio	SMPDB KEGG
Oxidação de ácidos graxos de cadeia ramificada	0,478	Ácido ascórbico; L-Carnitina; L-acetilcarnitina; Ácido oxoglutárico ; Pirofosfato; Ácido succínico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Ácido pristanico; Ácido fitânico; Propionilcarnitina; Acetil-CoA; Propionil-CoA; 2-hidroxitanoil-CoA; ADP; Phytanoyl-CoA; Pirofosfato de tiamina; Oxigênio; Coenzima A; Pristanal; Dióxido de carbono; Pristanoyl-CoA; Formil-CoA; 4,8 Dimetilnonanoil carnitina; 4,8-Dimetilnonanoil-CoA; Ferro	SMPDB KEGG
Oxidação peroxissômica de ácido fitânico	0,478	Ácido ascórbico; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Pirofosfato; Ácido succínico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Ácido pristanico; Ácido fitânico; NAD; Acetil-CoA; Isobutiril-CoA; Propionil-CoA; 2-hidroxitanoil-CoA; ADP; Phytanoyl-CoA; Pirofosfato de tiamina; Oxigênio; Coenzima A; NADH; Pristanal; Dióxido de carbono; Água; Formil-CoA; Ferro	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Síntese de Plasmalogênio	0,478	Monofosfato de citidina; NADP; NADPH; Magnésio; Ácido esteárico; NAD; Linoleoil-CoA; Estearoil-CoA; MANIA; Hidrogênio; Oxigênio; Citicolina; Coenzima A; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; CDP-Etanolamina; Água; Octadecanol; Peróxido de hidrogênio; 1-hexadecanol; Eicosanoil-CoA; Araquidonil-CoA; DHAP (18: 0); DHAP (18: 0e); LysoPA (18: 0e / 0: 0)	SMPD
Metabolismo de fenilalanina e tirosina	0,504	Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido acetoacético; Ácido homogentísico; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; L-tirosina; L-fenilalanina; Ácido fenilpirúvico; Ácido oxoglutárico ; Pirofosfato; Cálcio; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Fe ²⁺ ; Ácido 4-hidroxifenilpirúvico; MANIA; Ácido 4-fumarilacetoacético; Oxigênio; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Ácido maleylacetoacético; Água; 4a-hidroxitetra-hidrobiopterina; Peróxido de hidrogênio; Fe ³⁺ ; Ferro; L-eritro-tetrahidrobiopterina	SMPDB KEGG
Biossíntese de Fosfolipídios	0,517	Colina; Glicerilfosforiletanolamina; 3-fosfato de glicerol; Etanolamina; Cálcio; Magnésio; PC (16: 0/16: 0); PS (16: 0/16: 0); PA (16: 0/16: 0); Acetilcolina; NAD; FADH; MANIA; Manganês; Palmitil-CoA; Citicolina; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Fosforilcolina; CDP-DG (16: 0/16: 0); DG (16: 0/16: 0/0: 0); LysoPA (16: 0/0: 0); PE (16: 0/16: 0); PI (16: 0/16: 0); LysoPC (16: 0); PG (16: 0/16: 0); LysoPE (16: 0/0: 0); PGP (16: 0/16: 0); CL (16: 0/16: 0/16: 0/16: 0)	SMPDB
Ciclo da Ureia	0,517	Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido argininosuccínico; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; Ácido L-aspártico; Ácido oxoglutárico ; Ornitina; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Ureia; Cálcio; L-Arginina; Trifosfato de adenosina; Carbonato de hidrogênio; L-Glutamina; NAD; Citrulina; Fosfato de carbamóilo; Manganês; ADP; Fosfato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Água; Ácido fosfórico	SMPDB
Degradação de Lisina	0,529	Ácido L-glutâmico; L-lisina; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Ácido oxoadípico; Sacaropina; Ácido aminoadípico; Ácido L-pipecólico; NAD; Lipoamida; Ácido D-1-piperideina-2-carboxílico; 3-hidroxibutiril-CoA; Acetil-CoA; MANIA; Allylsine; Glutaril-CoA; Pirofosfato de tiamina; Oxigênio; Coenzima A; Acetoacetil-CoA; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Dióxido de carbono; Crotonoyl-CoA; Água; Peróxido de hidrogênio; D-lisina; S-Glutarildi-hidrolipoamida; (S) -2,3,4,5-Tetrahidropiperidina-2-carboxilato	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo de amido e sacarose	0,541	Ácido D-glucurônico; D-Maltose ; Pirofosfato; Sacarose; Trifosfato de uridina; Glicose de difosfato de uridina; 5'-difosfato de uridina; Cálcio; Íon cloreto; Trifosfato de adenosina; Magnésio; D-Fructose; Glicogênio; Ácido 3-fosfoglicérico; NAD; Ácido glucurônico difosfato de uridina; 1,3-bifosfato de ácido glicérico; ADP; Glicose 6-fosfato; Fosfato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Glicose 1-fosfato; Isovalerilglucuronida; Água; Alfa-D-glicose; Amilose; Alfa-D-glicose 1,6-bifosfato; Beta-D-Fructose 6-fosfato; Dextrina; Celulose microcristalina	SMPDB KEGG
Metabolismo de Purina	0,551	Adenina; Monofosfato de adenosina; Adenosina; Amônia; AMP cíclico; Desoxiinosina; Desoxiguanosina; Desoxiadenosina; Glicina; Guanina; Guanosina; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; Hipoxantina; Ácido inosínico; Trifosfato de inosina; Ácido L-aspártico; Inosina ; NADP; NADPH; Pirofosfato; Fosforibosilpirofosfato; Ácido úrico; Xantina; Xantosina; Cálcio; Ácido adenilsuccínico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Potássio; L-Glutamina; SAICAR; NAD; Monofosfato de desoxiadenosina; dGDP; 10-Formyltetrahydrofolate; Fosforibosilformilglicineamidina; 5'-monofosfato de 2'-desoxiguanosina; 5-fosforibosilamina; Ribose de difosfato de adenosina; Difosfato de guanosina; Ribonucleotídeo 5-aminoimidazol; MANIA; Trifosfato de guanosina; Íon zinco (II); 5'-Fosforibosil-N-formilglicinamida; Tetrafosfato de diguanosina; ADP; Desoxirribose 1-fosfato; Oxigênio; Monofosfato de guanosina; Fosfato; Fosforibosilformamidocarboxamida; dGTP; NADH; Ribose 1-fosfato; dADP; AICAR; Trifosfato de desoxiadenosina; D-Ribose 5-Fosfato ; Ácido xantílico; Ácido tetrahidrofólico; Dióxido de carbono; Glycineamideribotide; Água; Ácido fosfórico; Peróxido de hidrogênio; Heme; 5-Aminoimidazol-4-carboxamida; IDP; 2- (Formamido) -N1- (5-fosfo-D-ribosil) acetamidina; 5-amino-1- (5-fosfo-D-ribosil) imidazol-4-carboxilato; Fosfato 2', 3'-cíclico de guanosina; Fe3 +	SMPDB KEGG
Reciclagem de amônia	0,552	Biotina; Monofosfato de adenosina; Amônia; Glicina; Ácido L-glutâmico; L-Asparagina; L-histidina; L-serina; Ácido L-aspártico; Ácido oxoglutárico ; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Ácido urocânico; Trifosfato de adenosina; Magnésio; L-Glutamina; NAD; Fosfato de carbamóilo; MANIA; ADP; Fosfato; Ácido (R) -lipóico; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; 5,10-Metilen-THF; Ácido tetrahidrofólico; Dióxido de carbono; Água; Ácido fosfórico; Diidrolipoato; Ácido 8 - [(Aminometil) sulfanil] -6-sulfaniloctanóico; Ácido (S) – lipoico	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Degradação de Frutose e Manose	0,552	Frutose 6-fosfato; D-Manose; L-Fucose; NADP; NADPH; Sorbitol; Pirofosfato; Trifosfato de adenosina; Magnésio; D-Frutose; NAD; D-Frutose 2,6-bisfosfato; Gliceraldeído; Frutose 1,6-bisfosfato; Frutose 1-fosfato; Manose 6-fosfato; GDP-L-fucose; D-Gliceraldeído 3-fosfato; Difosfato de guanosina manose; Fucose 1-fosfato; Trifosfato de guanosina; Íon zinco (II); ADP; GDP-4-desidro-6-desoxi-D-manose; Fosfato; Fosfato de dihidroxiacetona ; NADH; Água; Ácido fosfórico; Alfa-D-glicose; D-Manose 1-fosfato; Beta-D-Frutose 2-fosfato	SMPDB KEGG
Metabolismo da Galactose	0,616	Melibiose; Galactitol ; D-glicose; Glicerol; D-Galactose; D-Manose; Alfa-lactose; mio-inositol; Sorbitol; Pirofosfato; Sacarose; Trifosfato de uridina; Glicose de difosfato de uridina; 5'-difosfato de uridina; Difosfatagalactose de uridina; Trifosfato de adenosina; Magnésio; Galactose 1-fosfato; D-Frutose; NAD; Maltotriose; Íon zinco (II); ADP; Glicose 6-fosfato; Fosfato; NADH; Glicose 1-fosfato; Água; Rafinose; Alfa-D-glicose; Estaquiose; Galactan; Galactinol; Galactosilglicerol; Melibiitol; Epimelibiose; Ferro; Celulose microcristalina	SMPDB KEGG
Metabolismo do glutamato	0,711	Biotina; Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido gama-aminobutírico; Glicina; Frutose 6-fosfato; Glutaciona; Ácido L-glutâmico; L-Alanina; Ácido L-aspartico; Ácido oxoglutárico ; NADP; NADPH; Ácido oxalacético; Ácido pirúvico; Pirofosfato; Ácido succínico; Fosforibosilpirofosfato; Trifosfato de adenosina; Magnésio; L-cisteína; L-Glutamina; NAD; gama-glutamylcisteína; 6-Fosfato de N-Acetil-D-Glucosamina; Fosfato de carbamoilo; 5-fosforibosilamina; Ribose de difosfato de adenosina; Dinucleotídeo de adenina de ácido nicotínico; Acetil-CoA; MANIA; 6-fosfato de glucosamina; Semialdeído de ácido succínico; Ácido 1-pirrolina-5-carboxílico; Íon zinco (II); ADP; Monofosfato de guanosina; Coenzima A; Fosfato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Ácido xantílico; Dióxido de carbono; Água; Ácido fosfórico; Glutaciona oxidada; Quitina; Ácido carbônico; Íon de hidrogênio	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(continuação)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo da arginina e da prolina	0,739	Tetraidrobiopterina; Monofosfato de adenosina; Amônia; Ácido argininosuccínico; Creatina; Glicina; Ácido guanidoacético; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; L-Proline; Ácido L-aspartico; Ácido oxoglutárico ; Ornitina; NADP; NADPH; Ácido oxalacético; Pirofosfato; Ácido succínico; Ureia; L-Arginina; Trifosfato de adenosina; NAD; Citrulina; S-adenosil-homocisteína; Fosfato de carbamoílo; S-adenosilmetionina; MANIA; Ácido 1-pirrolina-5-carboxílico; Manganês; ADP; Ácido pirrolina hidroxicarboxílico; Oxigênio; Fosfato; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; Fosfocreatina; Flavin Mononucleotide; Dióxido de carbono; Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutárico; L-glutâmico gama-semialdeído; Água; Ácido fosfórico; 1-pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato; Ácido 4-hidroxi-L-glutâmico; Peróxido de hidrogênio; Heme; Óxido nítrico; D-Proline; N- (o) - Hidroxiarginina; 4-hidroxi-L-prolina; L-4-hidroxiglutamato semialdeído; Ácido 1-pirrolina-2-carboxílico; Íon de hidrogênio	SMPDB KEGG
Degradação de Valina, Leucina e Isoleucina	0,783	Ácido alfa-cetoisovalérico; Ácido (S) -3-hidroxiisobutírico; Biotina; Ácido acetoacético; Ácido L-glutâmico; L-isoleucina; Ácido metilmalônico; Ácido oxoglutárico ; Ácido succínico; Ácido 3-metil-2-oxoalérico; Trifosfato de adenosina; Carbonato de hidrogênio; L-Leucina; Cetoleucina; L-Valina; NAD; Lipoamida; Diidrolipoamida; Metacrilil-CoA; Succinil-CoA; 2-metilbutiril-CoA; (S) -3-Hidroxiisobutiril-CoA; 3-metilglutaconil-CoA; Isovaleril-CoA; 2-metilacetoacetil-CoA; Acetil-CoA; Isobutiril-CoA; MANIA; Metilmalonil-CoA; Propionil-CoA; ADP; 2-metil-3-hidroxibutiril-CoA; Pirofosfato de tiamina; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; Oxigênio; Coenzima A; Fosfato; Acetoacetil-CoA; NADH; 5'-fosfato de piridoxal; 3-metilcrotonil-CoA; Piridoxal; Dióxido de carbono; Tiglyl-CoA; Adenosilcobalamina; Água; Ácido (S) -b-aminoisobutírico; Molibdopterina; Semialdeído de ácido (S) -metilmalônico; R-metilmalonil-CoA; S-metilmalonil-CoA; Peróxido de hidrogênio; 3-metil-1-hidroxibutil-ThPP; 2-metil-1-hidroxipropil-ThPP; S- (3-Metilbutanoil) -di-hidrolipoamida-E; S- (2-Metilpropionil) -di-hidrolipoamida-E; S- (2-Metilbutanoil) -di-hidrolipoamida; 3-hidroxiisovaleril-CoA; Lipoyl-GMP; Íon de hidrogênio	SMPDB KEGG

Tabela 4 – Vias metabólicas envolvidas no grupo CCEB

(conclusão)

Vias metabólicas	p-valor	Metabólitos da via	Referências
Metabolismo de tirosina	0,842	ácido p-hidroxifenilacético; Iodotirosina; 3-metoxitiramina; Tetraidrobiopterina; Ácido ascórbico; Amônia; Ácido acetoacético; Epinefrina; Dopamina; Ácido homovanílico; Ácido homogentísico; Ácido fumárico; Ácido L-glutâmico; L-tirosina; Metilamina; L-Dopa; Ácido L-aspartico; Ácido oxoglutarico ; Norepinefrina; NADP; NADPH; Ácido oxalacético; Tiroxina; Liotironina; Ácido vanilmandélico; Tiramina; 3,4-Dihidroxifenilglicol; Cálcio; Magnésio; Cobre; Ácido 4-hidroxifenilpirúvico; Normetanefrina; NAD; S-adenosilhomocisteína; Pirocatecol; S-adenosilmetionina; Dopaquinona; MANIA; Ácido 5,6-dihidroxiindole-2-carboxílico; Ácido desidroascórbico; Ácido 4-fumarilacetoacético; Ácido 3,4-dihidroxibenzenoacético; Oxigênio; Guaiacol; L-Dopachrome; NADH; Vanilglicol; 5'-fosfato de piridoxal; Ácido 3,4-dihidroxi mandélico; Dióxido de carbono; Ácido maleylacetoacético; Água; 4a-hidroxitetra-hidrobiopterina; Peróxido de hidrogênio; 3,5-Diiodo-L-tirosina; 3,4-Dihidroxifenilacetaldeído; 5,6-dihidroxiindole; 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldeído; Metanefrina; Leucodopachrome; Melanina; Homovanilina; 3,4-dihidroxi mandelaldeído; Indol-5,6-quinona; Ácido 2-hidroxi-3- (4-hidroxifenil) propenóico; Topaquinone; Fe ³⁺ ; Pirroloquinolina quinona; Ferro; Zinco; Íon de hidrogênio; Metilamônio	SMPDB KEGG

Legenda: A primeira coluna representa as vias metabólicas envolvidas no paciente com CCEB. A segunda coluna do p-valor foi calculada por meio da análise de enriquecimento com significância para $p < 0,05$. A terceira coluna envolve os metabólitos das vias, com destaque para os metabólitos grifados em vermelho que representam os metabólitos expressos nos pacientes com CCEB. A quarta coluna descreve as referências utilizadas.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

Por meio dos dados apresentados na Tabela 4, um total de 41 vias metabólicas foram identificadas como presentes nas amostras salivares com CCEB e dessas, 3 vias apresentavam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Dentre elas, pode-se citar as vias do malato-asparto ($p = 0,0229$), metabolismo de beta-alanina ($p = 0,0467$) e efeito Warburg ($p = 0,048$).

4.3.6 Análise de possíveis biomarcadores salivares para o grupo CCEB

A análise do metaboloma das principais patologias pode envolver basicamente duas áreas:

- a) a compreensão das vias metabólicas e seus processos dinâmicos alterados;
- b) a busca por possíveis biomarcadores, que podem ser diagnósticos, prognósticos ou de diferenciação de estágios.

No caso deste estudo, os objetivos envolveram a análise das vias metabólicas dos pacientes com câncer bucal (CCEB) e também a busca por possíveis biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce da doença. Assim, o biomarcador almejado nesta pesquisa não seria capaz de substituir os atuais métodos diagnósticos já consagrados para o CCEB, no entanto, seriam meios alternativos de se realizar uma triagem na população e assim conseguir realizar hipóteses diagnósticas e precoces.

A fim de atender a necessidade da descoberta de biomarcadores metabólitos para o diagnóstico de doença, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi desenvolvida e construída nesse estudo através por meio da plataforma de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0. Biomarcadores promissores apresentam alta sensibilidade e alta especificidade. A sensibilidade é a capacidade que o biomarcador tem de dar um resultado positivo quando o indivíduo realmente tem a doença, ou seja, são os verdadeiros positivos. A especificidade é a capacidade do biomarcador testar negativo para pacientes que não apresentam realmente a doença, ou seja, são verdadeiros negativos.

O valor da área sobre a curva, AUC, mede o desempenho dos biomarcadores. Assim, um excelente biomarcador apresenta AUC com valor de 1,0. No entanto, valores muito próximos de 1,0, como 0,9 ou 0,8 são valores considerados altos e de bom prognóstico para biomarcadores. Em nosso estudo, muitos metabólitos apresentaram valores com 0,9 e 0,8. Assim, consideramos relevantes para a pesquisa aqueles biomarcadores acima de 0,8 e que serão mais bem detalhados na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise da curva ROC para biomarcadores

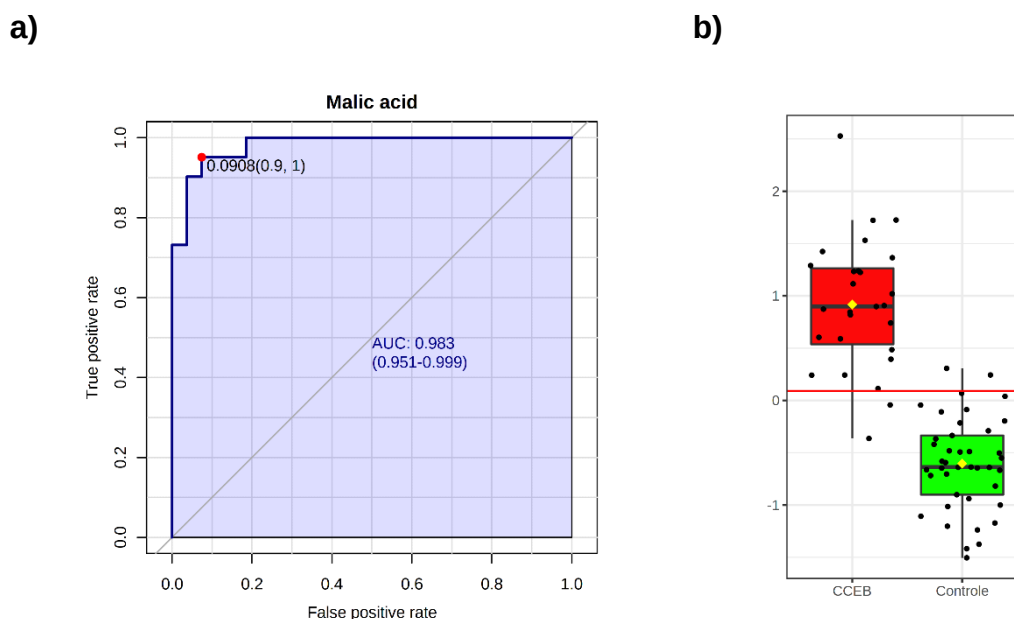
Metabólitos	AUC
Ácido málico	0,98103
Lactose	0,96387
Catecol	0,9467
Ácido 2-cetoadípico	0,94128
Maltose	0,9336
Metionina	0,92502
Ureia	0,92502
Leucina	0,92322
Inosina	0,92186
Ácido protocatecuico	0,91192
Fosfato de diidroxiacetona	0,89657
Ácido galacturônico	0,88573
Ácido margarico	0,86902
Uracil	0,86721
Ácido isocítrico	0,86585
Ribose 5-fosfato	0,84146
O-Fosfo-Serina	0,82385
Ácido indol-3-acético	0,82204
Ácido palmítico	0,82204
Ácido 2-cetoglutárico	0,81798
Ácido maleico	0,8103
Ácido pantotênico	0,80307
Espermidina	0,80217
Lactitol	0,80081

Legenda: A primeira coluna representa os metabólitos com predisposição de biomarcadores. A segunda coluna representa os valores de AUC de cada metabólito.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

O ácido málico foi o biomarcador encontrado com maior valor de AUC (0,98103) seguido pela lactose (0,96387) e mais 8 metabólitos com valor de AUC superiores a 0,9. Esses metabólitos não são apenas para os pacientes com CCEB, mas também para as amostras salivares do grupo controle. Assim, as Figuras 12 à 21 ilustram as curvas ROC dos 10 metabólitos com AUC maior que 0,9 e ao lado da curva ROC está a concentração normalizada dos metabólitos em cada grupo, desse modo é possível observar se determinado metabólito é um biomarcador sugestivo para o paciente com o CCEB ou para pacientes sem a doença (controle).

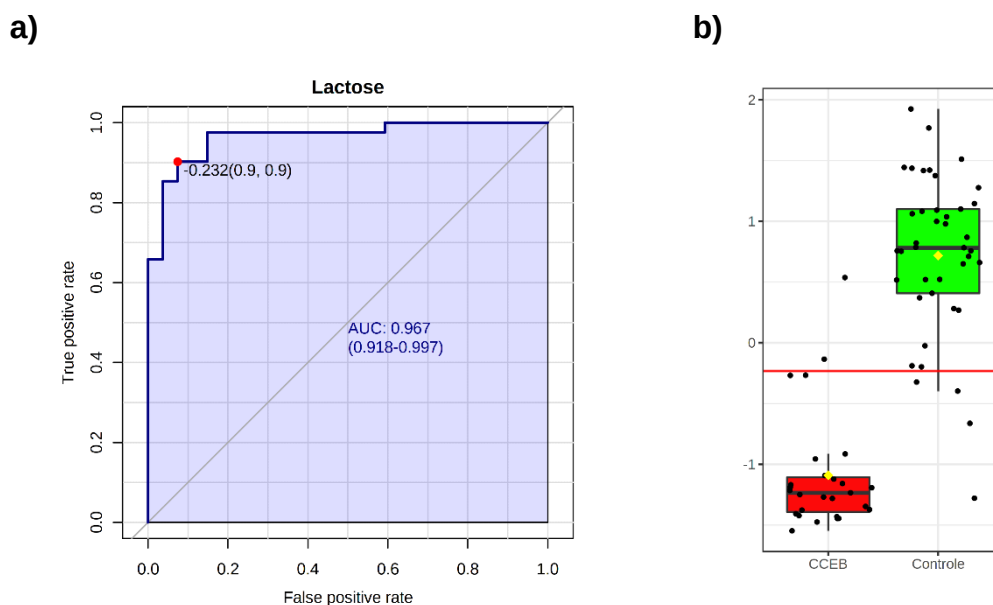
Figura 12 – Curva ROC do ácido málico



Legenda: a) Curva ROC do ácido málico com AUC. b) *Boxplot* do ácido málico representando que o ácido málico apresenta maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

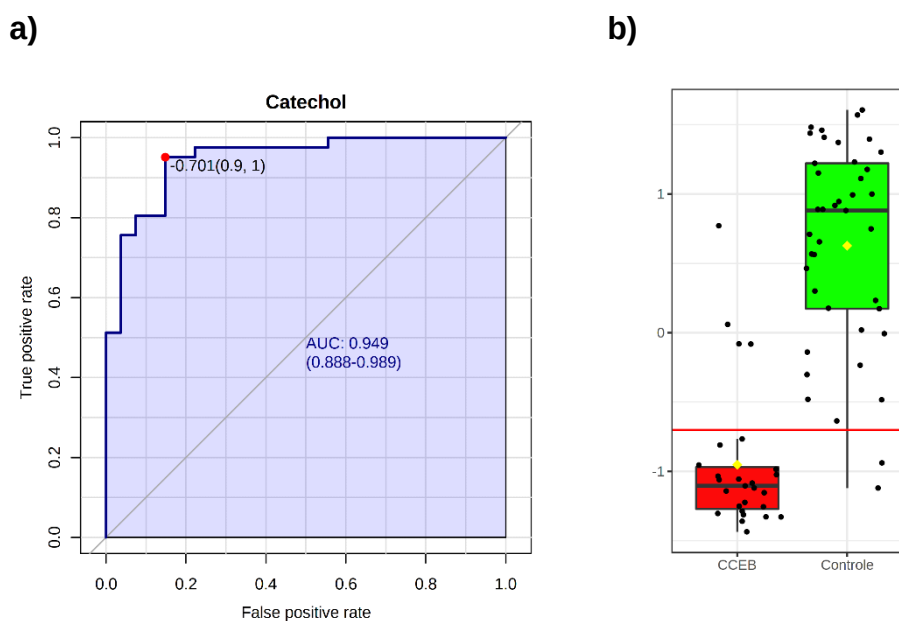
Figura 13 – Curva ROC da lactose



Legenda: a) Curva ROC da lactose com AUC. b) *Boxplot* da lactose demonstrando que aparece em maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

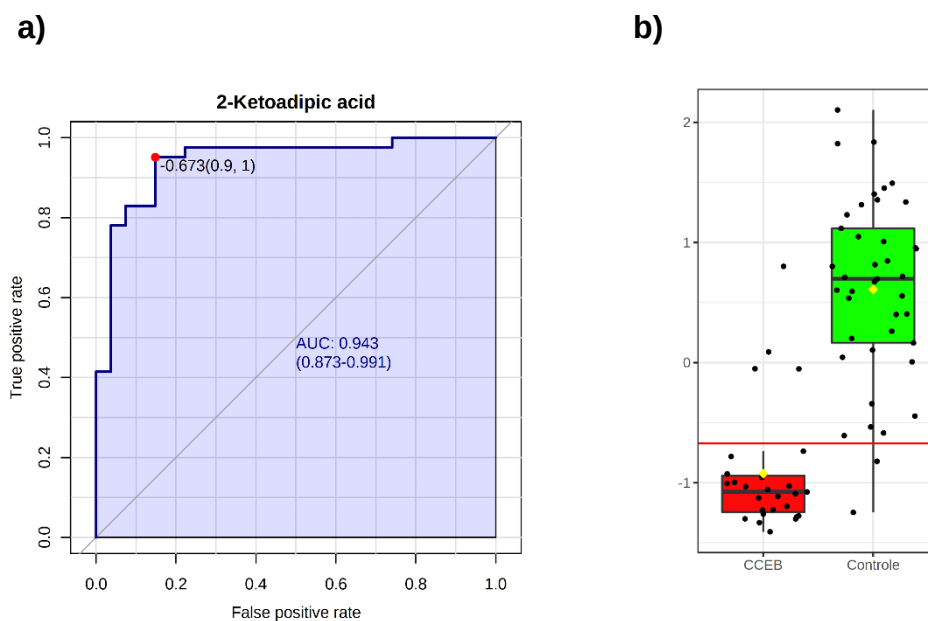
Figura 14 – Curva ROC do catecol



Legenda: a) Curva ROC do catecol com AUC. b) *Boxplot* do catecol que aparece em maiores concentrações no grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora através do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

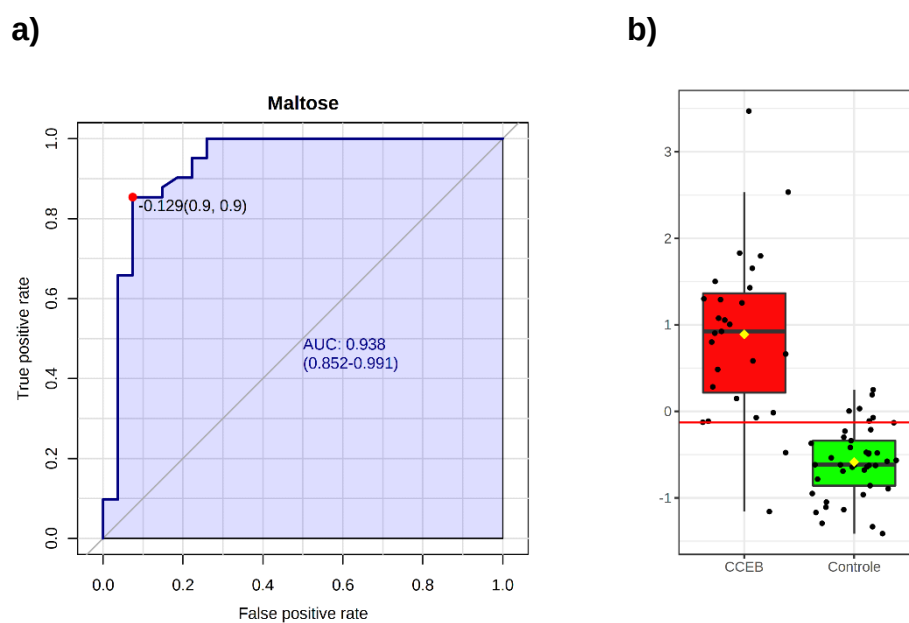
Figura 15 – Curva ROC do ácido 2-cetoadípico



Legenda: a) Curva ROC do ácido 2-cetoadípico com AUC. b) *Boxplot* do ácido 2-cetoadípico que aparece em maiores concentrações no grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

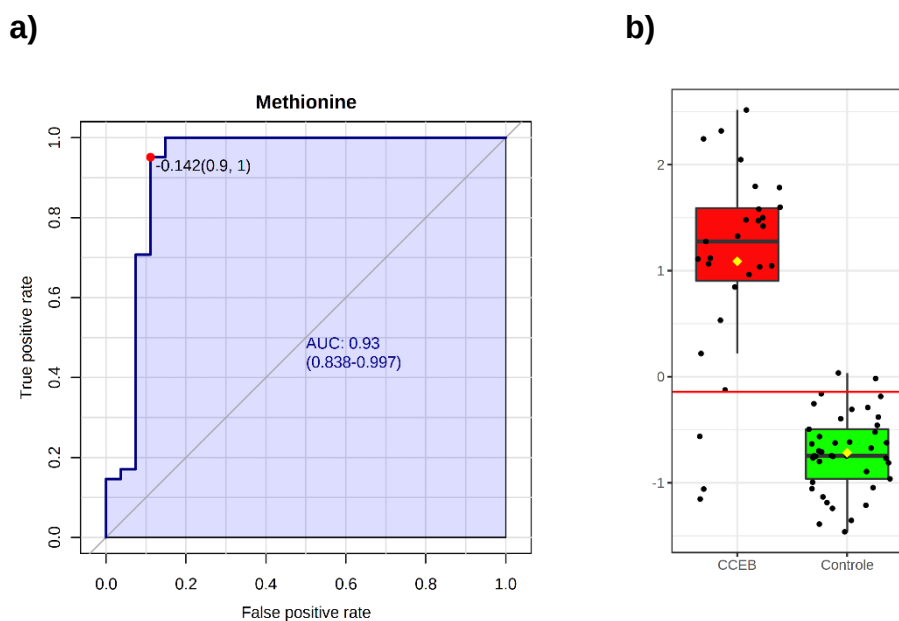
Figura 16 – Curva ROC da maltose



Legenda: a) Curva ROC da maltose com AUC. b) *Boxplot* da maltose que aparece em maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora através do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

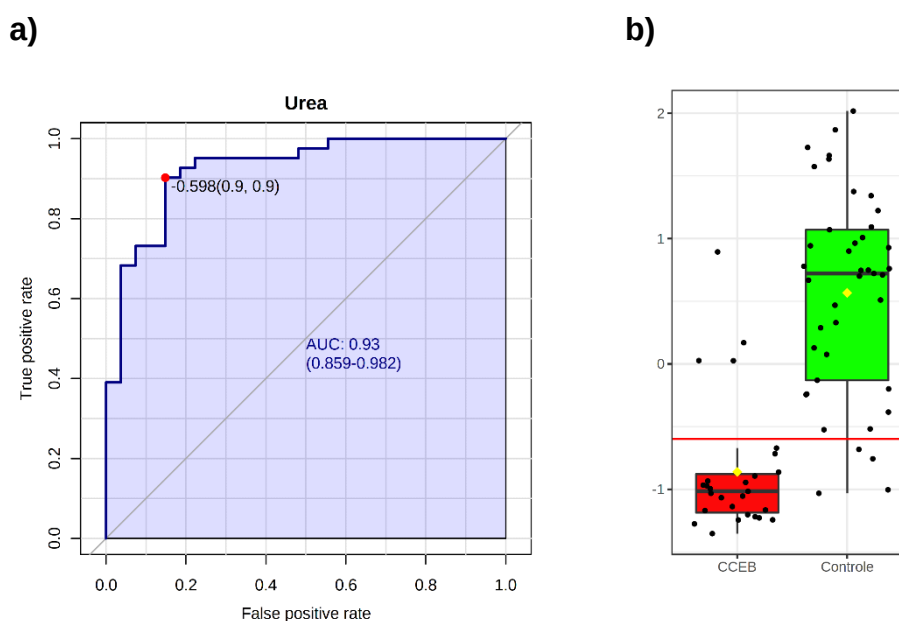
Figura 17 – Curva ROC da metionina



Legenda: a) Curva ROC da metionina com AUC. b) *Boxplot* da metionina aparece em maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

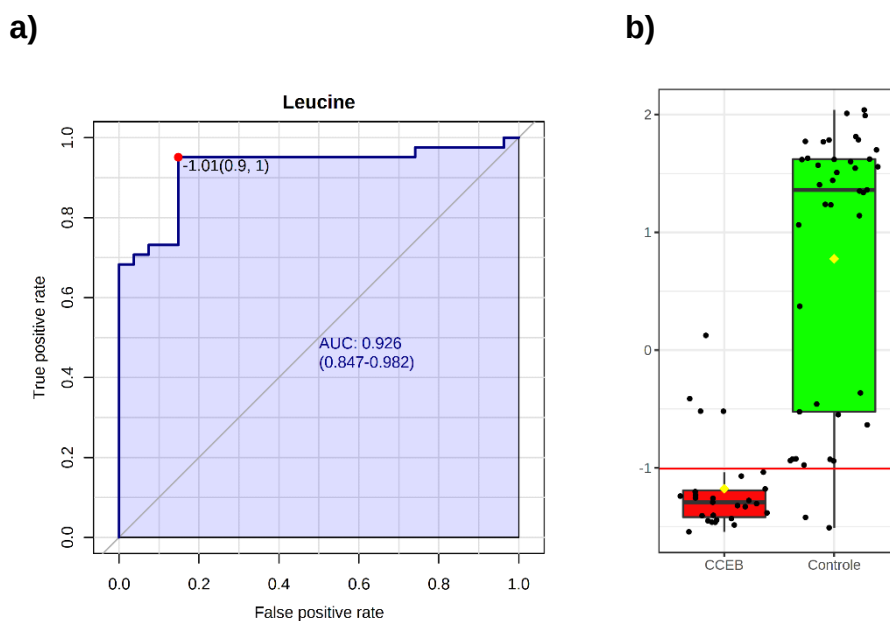
Figura 18 – Curva ROC da Ureia



Legenda: a) Curva ROC da ureia com AUC. b) *Boxplot* da ureia aparece em maiores concentrações no grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora através do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

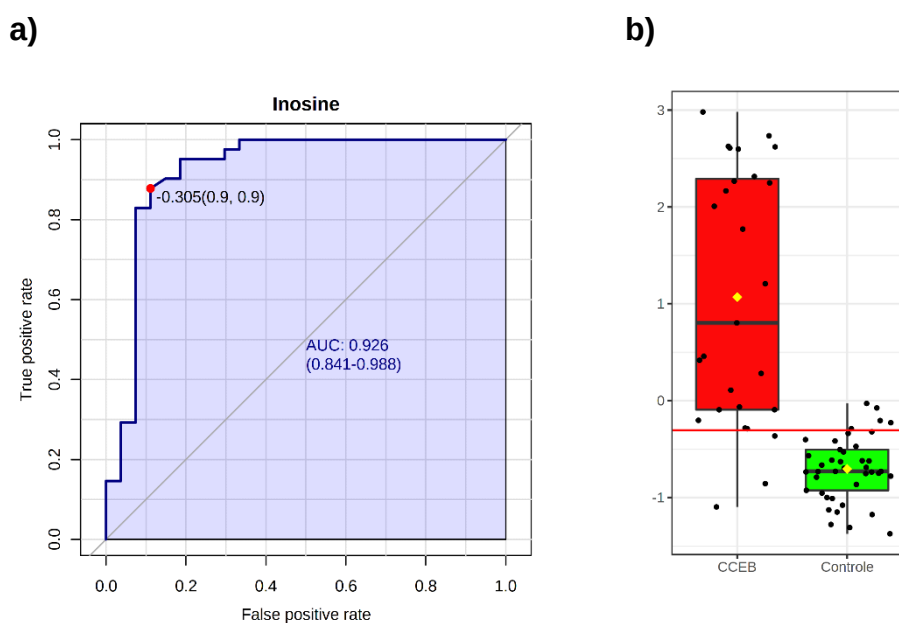
Figura 19 – Curva ROC da leucina



Legenda: a) Curva ROC da leucina com AUC. b) *Boxplot* da leucina aparece em maiores concentrações no grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

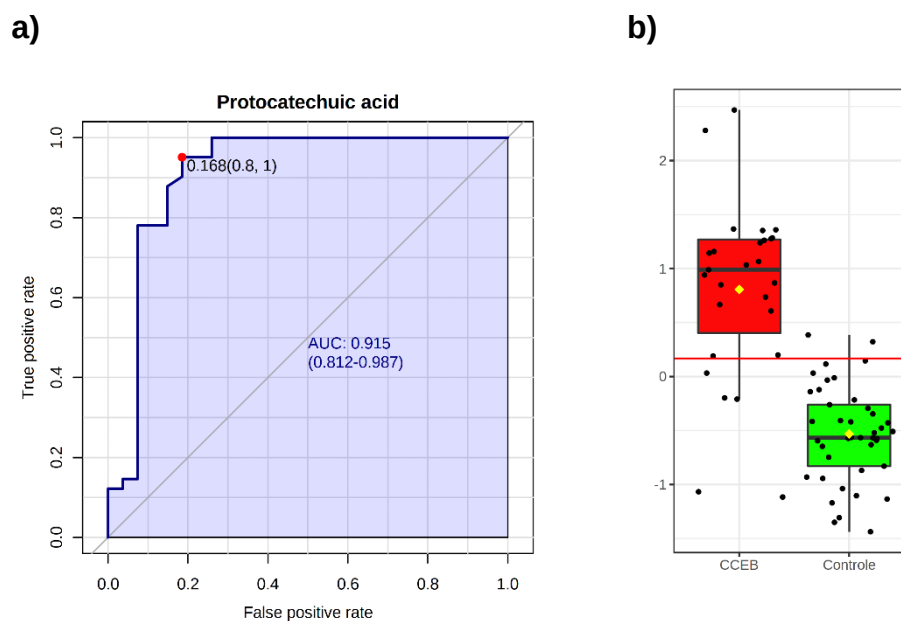
Figura 20 – Curva ROC da inosina



Legenda: a) Curva ROC da inosina com AUC. b) *Boxplot* da inosina aparece em maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora através do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

Figura 21 – Curva ROC do ácido protocatecuico



Legenda: a) Curva ROC do ácido protocatecuico com AUC. b) *Boxplot* do ácido protocatecuico apresenta-se em maiores concentrações no grupo CCEB.

Fonte: Elaborado pela autora por meio do *software* de acesso aberto *Metaboanalyst* 5.0.

5 DISCUSSÃO

O estudo do metaboloma salivar de pacientes com câncer bucal, especialmente o CCEB, é de extrema importância para a identificação das vias metabólicas que aparecem predominantemente alteradas possibilitando a descoberta de possíveis biomarcadores, o que traz expectativas de melhorar a capacidade de diagnóstico precoce dessa patologia e consequentemente a qualidade de vida dos pacientes.

Estudos prévios acerca do metaboloma salivar de pacientes com câncer bucal já foram descritos na literatura (Awasthi et al., 2017; Bel'skaya et al., 2020; Ishikawa et al., 2016; Lohavanichbutr et al., 2018; Mukherjee et al., 2016; Nguyen et al., 2020; Ohshima et al., 2017; Song et al., 2020; Sridharan et al., 2017; Sugimoto et al., 2010; Wang et al., 2014a; Wang et al., 2014b; Wei et al., 2011), além do próprio trabalho do nosso grupo de pesquisa, no qual foi realizado uma abordagem inicial de diferenciação dos metabólitos salivares de pacientes com câncer bucal e pacientes controles (Rodrigues, 2020). O presente estudo buscou as principais vias metabólicas salivares alteradas nos pacientes com a patologia em questão, e além disso buscou identificar os principais metabólitos que podem ser candidatos a biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce da doença, sendo os dois estudos do nosso grupo de pesquisa pioneiros nessa área na América latina.

O câncer bucal é o quarto mais frequente em pacientes do sexo masculino na região Sudeste do Brasil (INCA, 2020) e o décimo primeiro no ranking mundial em homens (WHO, 2020). Estes dados coincidem com o nosso estudo, no qual o grupo CCEB apresentou a maior proporção de homens, com idade média de 57 anos, ou seja, acima de 40 anos, fumantes ou ex-fumantes crônicos e etilistas (INCA, 2020; WHO 2020). Ao comparar o tempo de uso do cigarro, a carga tabágica e o número de cigarros fumados por dia, reafirmamos que o perfil de uso crônico do tabaco apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, demonstrando a associação que os hábitos tabágicos apresentam sobre o câncer bucal.

O tabaco é conhecido por mais de 69 produtos carcinogênicos (American Cancer Society, 2020; American Lung Association, 2020) que provocam os mais diversos tipos de câncer. Em relação ao câncer bucal, o tabagismo associado ao

alcoolismo promove um efeito sinérgico que aumenta em 10 vezes a chance de ocorrência da patologia (Batista et al., 2008). Em nosso estudo, 100% dos pacientes com CCEB mantinham o hábito do consumo alcoólico, totalizando a média do AUDIT de 9,19, ou seja, considerado uso de risco para o desenvolvimento de neoplasias. Estes resultados corroboram com a literatura no qual o tabagismo associado ao alcoolismo está associado a maior prevalência de câncer bucal em estágios avançados (Bezerra et al., 2018).

Como também evidenciado pelo nosso estudo, o CCEB é um câncer diagnosticado em estágios tardios, no qual 70% dos pacientes recebem o diagnóstico em estágios avançados da doença (estágio III e IV), demonstrando que o diagnóstico precoce permanece como um desafio para os profissionais envolvidos (Bandeira et al., 2017). É notável que o diagnóstico precoce implica em possibilidades maiores de cura, menor mutilação do paciente frente aos tratamentos realizados, diminuição da taxa de mortalidade e redução dos custos (Bandeira et al., 2017; Baumann et al., 2016; Gao et al., 2009; Thomas et al., 2020).

Frente a essa necessidade de diagnósticos precoces, pode-se evidenciar a área do estudo do metaboloma salivar com a possibilidade de identificação de vias metabólicas e biomarcadores diagnósticos. Assim, nosso estudo foi capaz de identificar 41 vias metabólicas relacionadas à saliva de pacientes com CCEB, dessas, 3 vias demonstraram diferença estatisticamente significativa: a lançadeira malato-aspartato, a via do metabolismo da beta-alanina e o efeito Warburg.

As células cancerígenas apresentam a característica de requisição maior de ATP em comparação às células saudáveis. Assim, altas taxas glicolíticas e fosforilação oxidativa mitocondrial são realizadas em abundância nas células tumorais com o objetivo de gerar uma maior quantia de ATP em um curto espaço de tempo (Alam et al., 2016). A fim de relembrarmos, a glicólise foi estudada pela primeira vez por Louis Pasteur em 1856 (Pasteur, 1860) e posteriormente por Buchner em 1947 (Buchner, 1947), sendo essa etapa responsável pela geração de 2 ATPs ao final do ciclo. A glicólise é a via metabólica escolhida pelo organismo na ausência do oxigênio, assim é gerada uma quantidade menor de energia (Buchner, 1947). Se o organismo se apresentar com abundância de oxigênio, o processo da glicólise será apenas o começo do ciclo da respiração aeróbica, no qual o lactato gerado pela glicólise será consumido pelo ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido como ciclo de Krebs

(Krebs, 1940). Durante o ciclo de Krebs, não se produz ATP diretamente, mas NADH e FADH₂ que são essenciais para a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa é o método preferido de geração de energia na presença de oxigênio, uma vez que o processo gera 38 ATPs em contrapartida com a glicólise que gera 2 ATPs (Boyer, 1973).

O ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) e a fosforilação oxidativa ocorrem dentro da mitocôndria, no entanto, o transporte do NADH para a matriz mitocondrial não é tão simples, necessita de um processo. Assim, a lançadeira malato-aspartato é responsável pelo processo de transporte do NADH do citoplasma para a matriz mitocondrial no processo de produção de ATP (Borst, 1962; Borst, 2020). Em nosso estudo, a lançadeira malato-aspartato é uma das vias alteradas, ou seja, encontra-se superexpressa, e relaciona-se diretamente com a produção energética das células tumorais. Com base nesses resultados, a alta produção energética das células tumorais viabiliza a multiplicação celular com maior facilidade em meio favorável para esse crescimento desordenado.

Há décadas que o metabolismo do câncer tem sido estudado, principalmente pelo entendimento de que as células precisam promover seu rápido crescimento, proliferação e sobrevivência (Liberti et al., 2016). Essas características são inerentes a um metabolismo alterado, deste modo, em 1920 Otto Warburg observou uma característica em comum no metabolismo das células tumorais. Essa característica era composta por aumento da captação da glicose com alta liberação de lactato, sinalizando que as células tumorais realizam uma alta taxa de glicólise mesmo na presença do oxigênio e mitocôndrias funcionando perfeitamente (Warburg, 1956). Esse processo foi denominado de Efeito Warburg e tem sido consagrado como a forma de geração de energia das células tumorais (Liberti et al., 2016; Potter et al., 2016; Vaupel et al., 2019; Warburg, 1956). Em nosso estudo, também foi constatado o efeito Warburg como uma das vias metabólicas ativadas nos pacientes com CCEB, evidenciando que o CCEB utiliza-se do efeito Warburg para suprir suas demandas energéticas.

Apesar do efeito Warburg ser consagrado como a forma das células tumorais adquirirem energia, diversos estudos têm demonstrado variadas linhagens de cânceres obtendo sua energia por meio da fosforilação oxidativa e conjuntamente com a glicólise. No estudo de Guppy e colaboradores (2002), o câncer de mama

apresentou 20% da produção de energia pela via glicolítica e 80% da energia advinha da fosforilação oxidativa. Rodríguez-Enriquez e colaboradores (2000) conseguiram demonstrar que as células do hepatoma da linhagem AS-30D apresentavam seu metabolismo energético baseado principalmente na via oxidativa, em contrapartida, uma parcela pequena era originada pela via glicolítica.

Em 2004, dois pesquisadores, Zu e Guppy, realizaram pesquisas experimentais com diversos tipos de cânceres a fim de medir a taxa de produção de ATP via glicolítica e oxidativa. Dentre os cânceres estudados, estão o carcinoma de mama, ovário, pulmão, uterino, melanoma, diversas linhagens de hepatoma e muitos outros. A média de contribuição da via glicolítica na produção do ATP foi de 17%, ou seja, o estudo concluiu que a grande maioria das células tumorais é capaz de gerar ATP por meio da fosforilação oxidativa, além de captar parte da energia por meio da glicólise e, alguns tumores, são glicolíticos como resultado do ambiente hipóxico.

Esses estudos corroboram com o nosso trabalho no qual tanto o efeito Warburg mostrou-se ativado e também a lançadeira malato-aspartato que contribui para a manutenção da fosforilação oxidativa. Estudos envolvendo o CCEB trazem de fato que o efeito Warburg está presente no metabolismo das células (Ishikawa et al., 2016; Oshima et al., 2017; Song et al., 2020; Wang et al., 2014b; Wei et al., 2011), no entanto, nosso estudo é pioneiro ao demonstrar que a fosforilação oxidativa também está presente nas células do CCEB.

Outra via que se mostrou alterada nos pacientes com CCEB e com significância estatística foi a via do metabolismo da beta-alanina. Beta-alanina é um aminoácido não essencial disponível em diversos suplementos esportivos, responsável pelo aumento do desempenho esportivo ao reduzir as fadigas e aumentar a força muscular (Caruso et al., 2012; Jordan et al., 2010). Além disso, beta-alanina é um precursor direto do ácido pantotênico que também estava superexpresso nas amostras de saliva dos pacientes com CCEB em nosso estudo. Assim, o metabolismo da beta-alanina torna-se essencial para a síntese da coenzima A (CoA), importante no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) (Hutschenreuther et al., 2013).

O estudo de Hutschenreuther e colaboradores (2013) demonstrou que a beta-alanina é um dos metabólitos relacionados à alta atividade glicolítica no câncer de mama, o que associa essa via com a agressividade das células tumorais. Em nosso estudo com CCEB, essa via também estava ativa e alterada, no entanto, outros

estudos sobre metabolômica salivar não demonstraram esse dado, sendo nosso estudo o pioneiro.

Um dos outros objetivos dessa pesquisa foi a identificação de possíveis biomarcadores. Assim, dez metabólitos foram listados com AUC superior a 0,9. Dentre eles, cinco metabólitos encontravam-se significativamente superexpressos nos pacientes com CEC: ácido málico, maltose, metionina, inosina e ácido protocatecuico. Enquanto os outros cinco metabólitos encontravam-se nos pacientes do grupo controle: lactose, catecol, ácido-2-cetoadípico, ureia e leucina. Desses metabólitos listados como possíveis biomarcadores, 4 deles já foram relatados em estudos anteriores envolvendo metaboloma salivar de pacientes com CCEB, são eles: ureia, leucina, inosina e metionina.

Ishikawa e colaboradores (2016) identificaram metabólitos que estavam elevados na saliva dos pacientes com CCEB e listaram os seguintes metabólitos: hipoxantina, guanina, guanosina, N-óxido de trimetilamina, espermidina, pipecolato, metionina. Destes, a metionina e a espermidina também foram encontrados como alterados em nossos pacientes com CCEB, apresentando um AUC respectivo de 0,92 e 0,80. Também no estudo de Ishikawa, o metabolismo da purina encontrava-se alterado, uma vez que os metabólitos hipoxantina, guanina e guanosina fazem parte dessa via. Contudo, em nosso estudo, da via do metabolismo da purina, apenas o metabólito inosina estava alterado e com potencial para biomarcador de pacientes com CCEB, assim como de outras doenças crônicas como a doença renal crônica (Alves, 2016).

A ureia é um metabólito que foi encontrado em baixas concentrações em pacientes com CCEB e em elevadas concentrações nos pacientes controles, indicando que o ciclo da ureia se encontra alterado nos pacientes com câncer bucal. Oshima e colaboradores (2017) foram os primeiros a descrever a ureia como um possível biomarcador para o câncer bucal. Em seu estudo, foram analisados os metabólitos salivares de pacientes japoneses com CCEB por meio da eletroforese capilar-espectrometria de massas (CE-MS).

A ureia é um metabólito produzido no fígado a partir da amônia que advém dos aminoácidos, consequentemente é um dos principais componentes produzidos pelo catabolismo das proteínas, estando presente na metade de todos os produtos sólidos produzidos pela urina (Oshima et al., 2017). Liang e colaboradores (2015)

estudaram o metaboloma de pacientes com câncer gástrico e observaram o aumento da ureia em pacientes com a doença. No entanto, em nosso estudo, a ureia apresentou aumento significativo nas amostras salivares de pacientes controles, sem CCEB, corroborando com os dados de Oshima (2017). Nosso estudo é o segundo estudo envolvendo pacientes com CCEB e que demonstra a capacidade do metabólito ureia ser um biomarcador para pacientes com a doença, visto sua subexpressão na saliva desses pacientes. Segundo Oshima (2017), pacientes com CCEB podem apresentar dificuldade de alimentação devido as dores e dificuldades de abertura bucal, o que torna difícil a ingestão de proteínas e consequentemente formação da ureia. Além disso, esses pacientes podem apresentar infecção pela *Helicobacter pylori*, que produz urease capaz de catalisar a ureia, o que diminui ainda mais a sua disponibilidade nesses pacientes (Shirai et al., 2011). Vale ressaltar, que a análise do microbioma de pacientes com CCEB pode ser de grande importância, pois a partir da identificação desses microrganismos, será possível também avaliar o secretoma, ou seja, metabólitos produzidos pelo microrganismo que foi isolado e, por fim, melhor compreender a sub ou superexpressão do metabólito com as vias metabólicas do microrganismo.

Outro metabólito encontrado em nosso estudo, e que esteve presente em outros estudos de metaboloma salivar, foi a leucina. Sugimoto et al. (2010) relataram 24 metabólitos salivares candidatos a biomarcadores para CCEB, dentre os quais também a leucina. Wei e colaboradores (2011) demonstraram que a leucina, isoleucina, valina e todos os intermediários dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) estavam diminuídos na saliva de pacientes com CCEB. O motivo dessa diminuição é que esses metabólitos estão envolvidos no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Assim, os autores acreditam que com a ativação da via glicolítica (efeito Warburg) ocorre uma diminuição da entrada de piruvato no ciclo do TCA, levando à escassez do fornecimento de energia via TCA. Consequentemente, a isoleucina, valina, leucina e todos os intermediários dos aminoácidos de cadeia ramificada acabam sendo menos necessários para o processo.

Além dos metabólitos citados acima, o ácido málico, maltose, ácido protocatecuico, lactose, ácido-2-cetoadípico e catecol também são potenciais biomarcadores de pacientes com CCEB para estudos futuros, considerando que nunca foram descritos em estudos anteriores de metabolômica salivar de pacientes

com CCEB. A discriminação desses metabólitos pode ser utilizada no rastreamento não invasivo do câncer bucal, uma vez que pelos dados apresentados em nosso estudo e comparados à literatura, o CCEB é frequentemente diagnosticado em estágios avançados, o que dificulta o prognóstico e a sobrevivência desses pacientes. Com o intuito de estudos futuros, sugiro a realização de uma metabolômica do tecido tumoral do carcinoma de células escamosas bucal, assim, seria possível a validação destes dados não somente no fluido oral, mas também no próprio tecido tumoral. Deste modo, partiríamos para futuramente a realização de uma triagem metabolômica salivar em populações expostas aos fatores de risco, tal como tabagismo e álcool, podendo vir a evidenciar possíveis biomarcadores salivares do câncer bucal que, conjuntamente com a biópsia tradicional, poderá implementar a detecção precoce do CCEB.

6 CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar possíveis biomarcadores salivares de diagnóstico para o CCEB, além de identificar vias metabólicas alteradas nesses pacientes. Deste modo, três importantes vias metabólicas alteradas foram investigadas: a lançadeira malato-aspartato, a via do metabolismo da beta-alanina e o efeito Warburg. Todas essas vias estão relacionadas com a produção de energia celular na carcinogênese, promovendo um ambiente favorável para o alto consumo energético e sobrevivência celular.

A fim de identificar metabólitos que são possíveis biomarcadores salivares, um AUC de 0,9 foi capaz de rastrear metabólitos como ureia, leucina, inosina e metionina como possíveis biomarcadores salivares de pacientes com CCEB, uma vez que eles já foram relatados na literatura em estudos anteriores. Além desses, seis outros metabólitos apresentaram AUC acima de 0,9 e são relatados pela primeira vez, por meio do presente estudo de metaboloma salivar de pacientes sul-americanos com câncer bucal, são eles: ácido málico, maltose, ácido protocatecuico, lactose, ácido-2-cetoadípico e catecol.

Podemos assim concluir, que essas alterações metabólicas podem auxiliar na identificação de biomarcadores salivares de pacientes com câncer bucal, sugerindo portanto, que outros estudos com uma amostra maior, assim como a realização de uma metabolômica tecidual no tecido tumoral, possam ser realizados como estudos futuros a fim de validar nossos resultados.

REFERÊNCIAS*

Alam MM, Lal S, FitzGerald KE, Zhang L. A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clin Transl Med.* 2016 Mar 2;5(1):3. doi:10.1186/s40169-016-0082-9. PubMed PMID: 26812134

Alves LAC. Estudo do metaboloma de biofluidos em pacientes pediátricos nefropatas e sua associação com a doença periodontal [tese]. São Paulo (São Paulo): Universidade de São Paulo; 2016.

American Cancer Society [Internet]. Atlanta (Geórgia): American Cancer Society [cited 2020 Mar 11]. Tabaco: Qual é o custo para você? Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/pt/booklets-flyers/tobacco-what-is-it-costing-you-portuguese.pdf>

American Lung Association [Internet]. Chicago (Illinois): American Lung Association [cited 2020 Mar 11]. What's in a cigarette? Available from: <https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette>.

Anggård E, Sedvall G. Gas chromatography of catecholamine metabolites using electron capture detection and mass spectrophotometry. *Anal Chem.* 1969;41(10):1250-6. doi:10.1021/ac60279a042.

Awasthi N. Role of salivary biomarkers in early detection of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017 Oct-Dec;60(4):464-8. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_140_16. PubMed PMID: 29323056.

Bandeira CM, de Almeida AA, Carta CFL, Almeida JD, Kaminagakura E. How to improve the early diagnosis of oral cancer? *Braz Dent Sci.* 2017; 20(4): 25- 31. doi: 10.14295/bds.2017.v20i4.1439.

Bandeira CM. Estudo da expressão gênica dos principais metabolizadores de fase ii de xenobióticos: GSTM1, GSTP1 e GSTT1 em carcinoma de células escamosas bucal [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

Barnes V, Ciancio S, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, et al. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res.* 2011;90(11):1293–7. doi: 10.1177/0022034511416240. PubMed PMID: 21856966.

Baumann E, Koller M, Wiltfang J, Wenz HJ, Moller B, Hertrampf K. Challenges of early detection of oral cancer: raising awareness as a first step to successful campaigning. *Health Educ Res.* 2016;31(2):136-45.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*. 2018 Nov 17;14(11):152. doi: 10.1007/s11306-018-1449-2. PMID: 30830421.

Beger RD. A Review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*. 2013;3(3):552–74. doi: 10.3390/metabo3030552. PubMed PMID: 24958139; PubMed Central PMCID: PMC3901293.

Bel'skaya LV, Sarf EA, Solomatin DV, Kosenok VK. Diagnostic and prognostic value of salivary biochemical markers in oral squamous cell carcinoma. *Diagnostics*. 2020 Oct 14;10(10):818. doi:10.3390/diagnostics10100818. PubMed PMID: 33066436.

Bennett D. Growing pains for metabolomics: the newest 'omic science is producing results--and more data than researchers know what to do with. *The Scientist*. 2005 Aug 25;19(8):25-8.

Bezerra NV, Leite KL, de Medeiros MM, Martins ML, Cardoso AM, Alves PM, et al. Impact of the anatomical location, alcoholism and smoking on the prevalence of advanced oral cancer in Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 May 1;23(3):e295-e301. doi: 10.4317/medoral.22318.

Bigler LR, Streckfus CF, Dubinsky WP. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. *Clin Lab Med*. 2009;29(1):71-85. doi: 10.1016/j.cll.2009.01.004. PubMed PMID:19389552.

Borst P. The aerobic oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide formed by glycolysis in Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochim Biophys Acta*. 1962;57:270–82.

Boyer PD, Cross RL, Momsen W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973;70(10):2837-9.

Brown MV, McDunn JE, Gunst PR, Smith EM, Milburn MV, Troyer DA, et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genome Med*. 2012;4(4):33. doi: 10.1186/gm332. PubMed PMID: 22546470; PubMed Central PMCID: PMC3446261.

Buchner T. Über ein phosphat übertragendes Gärungsferment. *Biochim Biophys Acta*. 1947;1:292–314.

Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2488-92. PMID: 8653682.

Caruso J, Charles J, Unruh K, Giebel R, Learmonth L, Potter W. Ergogenic effects of β -alanine and carnosine: proposed future research to quantify their efficacy. *Nutrients*. 2012;4(7):585-601. doi:10.3390/nu4070585. PubMed PMID: 22852051.

Center for Disease Control and Prevention. CDC [Internet]. Estados Unidos da América: CDC [cited 2020 Jul 15]. Available from: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/

Center for Disease Control and Prevention. CDC [Internet]. Estados Unidos da América: CDC [cited 2020 Mar 11]. Tobacco. Available from: <https://www.cdc.gov/biomonitoring/tobacco.html>

Chang CM, Corey CG, Rostron BL, Apelberg BJ. Systematic review of cigar smoking and all cause and smoking related mortality. *BMC Public Health*. 2015;15:390. doi: 10.1186/s12889-015-1617-5. PubMed PMID: 25907101; PubMed Central PMCID: PMC4408600.

Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF. Saliva composition and exercise. *Sport Med*. 1998;26(1):17–27. doi: 10.2165/00007256-199826010-00002. PubMed PMID: 9739538.

Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, et al. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*. 2006 Apr 20;440(7087):1073–7. doi: 10.1038/nature04648. PubMed PMID: 16625200.

D'Agostino RB, Belanger A, Agostino RBD. A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am Stat*. 1990;44(4):316–21. doi: 10.2307/2684359.

DATA SUS [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde [cited 2020 Apr 01]. Décima Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10 - 1997). Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060203>.

DeJongh DC, Radford T, Hribar JD, Hanessian S, Bieber M, Dawson G, et al. Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. *J Am Chem Soc*. 1969;91:1728-1740.

Fagerström K. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the fagerstrom test for cigarette dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012 Jan;14(1):75-8. doi: 10.1093/ntr/ntr137. PubMed PMID: 22025545.

FDA - U.S. Food and Drug [Internet]. Washington D.C. (Washington): Food and Drug Administration [cited 2020 Mar 11]. Chemicals in Tobacco Products and Your Health. Available from: <https://www.fda.gov/tobacco-products/health-information/chemicals-tobacco-products-and-your-health>.

Ferretti Y. Ferramenta computacional para análise integrada de dados clínicos e biomoleculares [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP), Interunidades em Bioinformática; 2015 [citado 2020 Dec 22]. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/95/95131/tde-05042016-093735/pt-br.php>.

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol.* 2002 Jan;48(1-2):155–71. PubMed PMID: 11860207.

Fiehn O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016 Apr 1;114:30.4.1-30.4.32. doi: 10.1002/0471142727.mb3004s114.

Fontes P, Corrêa G, Issa J, Brandão A, Almeida J. Comparison of exfoliative pap stain and agnor counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head Neck Pathol.* 2008;2(3):157–62. doi: 10.1007/s12105-008-0059-0. PubMed PMID: 20614310.

Gao W, Guo CB. Factors related to delay in diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 May;67(5):1015-20. doi: 10.1016/j.joms.2008.12.022. PubMed PMID: 19375011.

Gelpi E, Koenig WA, Gibert J, Oro J. Combined gas chromatography-mass espectrometry of amino acid derivados. *J Chromatogr Sci.* 1969;7(10): 604–13. <https://doi.org/10.1093/chromsci/7.10.604>.

Giskeødega GF, Bertilsson H, Selnaes KM, Wright AJ, Bathen T, Viset T. Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS One.* 2013;8(4):1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0062375. PubMed PMID: 23626811; PubMed Central PMCID: PMC3633894.

Gréen K. Gas chromatography--mass spectrometry of O-methyloxime derivatives of prostaglandins. *Chem Phys Lipids.* 1969;3(3):254-272. doi:10.1016/0009-3084(69)90017-6.

Güneri P, Epstein JB. Late stage diagnosis of oral cancer : components and possible solutions. *Oral Oncol.* 2014;50:1131–6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.09.005. PubMed PMID: 25255960.

Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J.* 2002;364(Pt 1):309-15. doi:10.1042/bj3640309. PubMed PMID: 11988105.

Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell.* 2008;5(5):714–7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.026.

Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emerg Med J.* 2017;34(6):357-59. doi:10.1136/emered-2017-206735.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva : Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85(2):162–9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778. PubMed PMID: 11208206.

Hutschenreuther A, Birkenmeier G, Bigl M, Krohn K, Birkemeyer C. Glycerophosphoglycerol, beta-alanine and pantothenic acid as metabolic companions of glycolytic activity and cell migration in breast cancer cell lines. *Metabolites*. 2013 Nov 27;3(4):1084-1101. doi:10.3390/metabo3041084. PubMed PMID: 24958267.

INCA. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Estimativa 2020. [cited 2020 Mar 11]. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Rio de Janeiro (RJ): INCA [cited 2020 Aug 04]. Tabagismo passivo. Available from: <https://www.inca.gov.br/tabagismo/tabagismo-passivo>.

Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, Sugano A. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep*. 2016 Aug;19;60:31520. doi: 10.1038/srep31520. PubMed PMID: 27539254; PubMed Central PMCID: PMC4990923.

Jordan T, Lukaszuk J, Misic M, Umoren J. Effect of beta-alanine supplementation on the onset of blood lactate accumulation (OBLA) during treadmill running: pre/post 2 treatment experimental design. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010 May 19;7:20. doi:10.1186/1550-2783-7-20. PubMed PMID: 20482881.

Kaddurah-daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics : A global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Of Pharmacology Toxicol*. 2008;48:653–638. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715. PubMed PMID: 18184107.

Khodadadi M, Pourfarzam M. A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography – mass spectrometry. *Metabolomics*. 2020;16(6):1–14. doi: 10.1007/s11306-020-01687-x. PubMed PMID: 32419109.

Kim J, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res*. 2006;66(18):8927–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1501. PubMed PMID: 16982728.

Krebs HA. The citric acid cycle and the szent-györgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J*. 1940;34(5):775-9. doi:10.1042/bj0340775.

Liang Q, Wang C, Li B. Metabolomic analysis using liquid chromatography mass spectrometry for gastric cancer. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(8):2170-184. doi:10.1007/s12010-015-1706-z. PubMed PMID: 26088916.

Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211-8. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.

Lindon JC, Keun HC, Ebbels TM, Pearce JM, Holmes E, Nicholson JK. The consortium for metabonomic toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics*. 2005;6(7):691-99. doi:10.2217/14622416.6.7.691. PubMed PMID: n° 16207146.

Lindon JC, Nicholson JK. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology The emergent role of metabolic phenotyping in dynamic patient stratification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;5255. doi: 10.1517/17425255.2014.922954. PubMed PMID: 24905565.

Liu R, Li Q, Ma R, Lin X, Xu H, Bi K. *Analytica Chimica Acta* Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method : Application to identify potential markers for human hepatic cancer. *Anal Chim Acta*. 2013;791:36–45. doi: 10.1016/j.aca.2013.06.044. PubMed PMID: 23890604.

Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, et al. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One*. 2018 Sep 20;13(9):e0204249. doi: 10.1371/journal.pone.0204249.

Lu H, Liang Y, Dunn WB, Shen H, Kell DB. Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS *Trends Analyt Chem*. 2008;27(3):215–27.

Ma Y, Zhang P, Wang F, Liu W, Yang J. An integrated proteomics and metabolomics approach for defining oncofetal biomarkers in the colorectal cancer. *Ann Surg*. 2012;4:720–30. doi: 10.1097/SLA.0b013e31824a9a8b. PubMed PMID: 2239509.

Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2017 Feb;43:34-40. doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001. Epub 2016 Aug 28. PMID: 27580257; PMCID: PMC5305426.

Mcmurray HR, Sampson ER, Compitello G, Kinsey C, Newman L, Smith B, et al. Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature*. 2008;453(June). doi: 10.1038/nature06973. PubMed PMID: 18500333. PubMed Central PMCID: PMC2613942.

Mikkonen J, Singh S, Herrala M, Lappalainen R, Myllymaa S, Kullaa A. Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *J Periodont Res*. 2016;51:431–7. doi: 10.1111/jre.12327. PubMed PMID: 26446036.

Mishra A, Verma M. Cancer Biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers (Basel)*. 2010;2:190–208. doi: 10.3390/cancers2010190. PubMed PMID: 24281040. PubMed Central PMCID: PMC3827599.

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. Adaptation and validation of the alcohol use disorders identification test (AUDIT) for a river population in the Brazilian Amazon. *Cad Saude Publica*. 2011 Mar;27(3):497-509. doi: 10.1590/s0102-311x2011000300010. PMID: 21519700.

Moro Js, Maroneze MC, Ardenghi TM, Barin LM, Danesi CC. Oral and oropharyngeal cancer : epidemiology and survival analysis. *Einstein*. 2018;16(2):1–5. doi: 10.1590/S1679-45082018AO4248. PubMed PMID: 29898090.

Mukherjee PK, Funchain P, Retuerto M, Jurevic RJ, Fowler N, Burkey B et al. Metabolomic analysis identifies differentially produced oral metabolites, including the oncometabolite 2-hydroxyglutarate, in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BBA Clin*. 2016 Dec 18;7:8-15. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.12.001. PubMed PMID: 28053877.

National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Office on Smoking and Health. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA. : U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2014.

Navazesh M, Kumar S. Measuring salivary flow Challenges and opportunities Mahvash. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(May):35S-40S. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0353. PubMed PMID: 18460678.

NCI - National Cancer Institute [Internet]. NCI - National Cancer Institute [cited 2020 Aug 04]. Biomarker. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>.

Neville B, Day T. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(4):195–215. doi: 10.3322/canjclin.52.4.195. PubMed PMID: 12139232.

Nguyen TTH, Sodnom-Ish B, Choi SW, Jung HI, Cho J, Hwang I, et al. Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020 Oct 31;46(5):301-12. doi: 10.5125/jkaoms.2020.46.5.301. PMID: 33122454; PMCID: PMC7609938.

Niehaus Jr WG, Ryhage R. Determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids by combination gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*. 1968;40:1840–7.

Ohshima M, Sugahara K, Kasahara K, Katakura A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017;37:2727–34. doi: 10.3892/or.2017.5561. PubMed PMID: 28393236.

Organização Mundial da Saúde – OMS [Internet]. Geneva: OMS. [cited 2020 Mar 10]. Fact Sheets by Cancer 2015. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

Papadimitropoulos MP, Vasilopoulou CG, Maga-Nteve C, Klapa MI. Untargeted GC-MS metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2018;1738:133-47. doi:10.1007/978-1-4939-7643-0_9. PubMed PMID: 29654587.

Pauster L. *Mémoire sur la fermentation alcoolique*. Paris: Imprimeria de Mallet-Bachelier. 1860.

Potter M, Newport E, Morten KJ. The warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15;44(5):1499-505. doi: 10.1042/BST20160094. PubMed PMID: 27911732.

Rai V, Mukherjee R, Ghosh AK, Routray A. Archives of Oral Biology “ Omics ” in oral cancer : new approaches for biomarker discovery. *Arch Oral Biol*. 2018 Feb;87:15-34. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.003. PubMed PMID: 29247855.

Reichert J, Araújo AJ De, Maria C, Gonçalves C, Godoy I, Chatkin JM, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845–80.

Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94. PMID: 26617944.

Rodrigues NS. Estudo do metaboloma salivar em pacientes com diagnóstico de câncer bucal [dissertação]. São José dos Campos (São Paulo): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000;375(1):21-30. doi:10.1006/abbi.1999.1582. PubMed PMID: 10683245.

Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine function in periodontal. *Front Immunol*. 2015;6(May):1–15. doi: 10.3389/fimmu.2015.00214. PubMed PMID: 25999952.

Samaranayake L. Saliva as a diagnostic fluid. *Int Dent J*. 2007 Oct;57(5):295-9. doi: 10.1111/j.1875-595x.2007.tb00135.x.

Santosh A, Jones T, Harvey J. A review on oral cancer biomarkers : understanding the past and learning from the present. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):486–92. doi: 10.4103/0973-1482.176414. PMID: 27461598.

Scott SE, Grunfeld EA, McGurk M. The idiosyncratic relationship between diagnostic delay and stage of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005;41:396–403. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.10.010. PubMed PMID: 15792612.

Scully C. Oral cancer a etiopathogenesis : past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2011;16(3):306–11. doi: 10.4317/medoral.16.e306. PubMed PMID: 21441876.

Seoane J, Diz P, Is TB, Diz Pedro. Is diagnostic delay related to advanced- stage oral cancer ? A meta-analysis. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(26):541–6. PubMed PMID: 19758250.

Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:1–22.

Shirai M. Transcription regulation of the urease operon in *Helicobacter pylori* in response to pH and mechanisms of stable colonization in the stomach. *Yamaguchi Med.* 2001;50:593-601.

Song X, Yang X, Narayanan R, Shankar V, Ethiraj S, Wang X, et al. Oral squamous cell carcinoma diagnosed from saliva metabolic profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jul 14;117(28):16167-73. doi: 10.1073/pnas.2001395117.

Sridharan G, Ramani P, Patankar S. Serum metabolomics in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2017;13(3):556-61. doi:10.4103/jcrt.JCRT_1233_16. PubMed PMID: 28862226.

Streckfus CF, Brown RE, Bull JM. Proteomics, morphoproteomics, saliva and breast cancer: an emerging approach to guide the delivery of individualised thermal therapy, thermochemotherapy and monitor therapy response. *Int J Hyperthermia.* 2010;26(7):649-61. doi: 10.3109/02656736.2010.506470.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral , breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.* 2010;6:78–95. doi: 10.1007/s11306-009-0178-y. PubMed PMID: 20300169; PubMed Central PMCID: PMC2818837.

Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I, Toyama T, Yoshimoto N. Clinica Chimica Acta Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2016;452:18–26. doi: 10.1016/j.cca.2015.10.032. PubMed PMID: 26523874.

Thomas A, Manchella S, Koo K, Tiong A, Nastri A, Wiesenfeld D. The impact of delayed diagnosis on the outcomes of oral cancer patients: a retrospective cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020 Sep 8;S0901-5027(20)30326-X. doi:10.1016/j.ijom.2020.08.010. PubMed PMID: 32917484.

Thomson PJ. Oral precancer: diagnosis and management of potentially malignant disorders. Chichester: Wiley-Blackwell; 2012. p. 31-47. ISBN: 978-1-444-33574-3.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029–33. doi: 10.1126/science.1160809. PubMed PMID: 19460998; PubMed Central PMCID: PMC2849637.

Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol.* 2019 Jul;95(7):912-9. doi: 10.1080/09553002.2019.1589653. PMID: 30822194. PubMed PMID: 30822194.

Villas-Bôas SG, Gombert AK. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotechnol Cienc Desenvol.* 2006;9(36):58-69.

Wang D, Bodovitz S. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends Biotechnol.* 2010;28(6):281-90. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.002

Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2014a Jan 1;427:79-85. doi: 10.1016/j.cca.2013.10.004. PubMed PMID: 24144867.

Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep.* 2014b Oct 30;4:6802. doi: 10.1038/srep06802. PubMed PMID: 25354816.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14. doi:10.1126/science.123.3191.309. PubMed PMID: 13298683.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002. PMID: 18804401.

Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer Salivary.* 2011;2217:2207-17. doi: 10.1002/ijc.25881. PubMed PMID: 21190195.

WHO World Health Organization [Internet]. [cited 2020 Mar 11]. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/> World Health Organization.

World Health Organization - WHO. Biomarkers in risk assessment: validity and validation: environmental health criteria series. Geneva: WHO; 2001. ISBN 9241572221.

WHO World Health Organization. Tobacco. Site OMS [Internet]. Suíça: OMS [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/tobacco>.

Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ.* 2001 Apr;65(4):306-12. PMID: 11336115.

Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc.* 2006;34(4):303-8. PubMed PMID: 16900988.

Wong DT. Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6:267–72. doi: 10.1586/14737159.6.3.267. PubMed PMID: 16706730.

Wu AHB, Colby J. Chapter 17 high-resolution mass spectrometry for untargeted drug screening. *Clin Appl Mass Spectrom Drug Anal.* 2016;1383:153–66. doi: 10.1007/978-1-4939-3252-8. PubMed PMID: 26660184.

Ye G, Liu Y, Yin P, Zeng Z, Huang Q, Kong H, et al. Study of induction chemotherapy efficacy in oral squamous sell carcinoma using pseudotargeted metabolomics. *J Proteome Res.* 2014;13:1994–2004. doi: 10.1021/pr4011298. PubMed PMID: 24552607.

Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and Treatment. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168:1718–27. doi: 10.1007/s12010-012-9891-5. PubMed PMID: 22971835.

Zhao Y. Metabolomics in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2013;422:59–69. doi: 10.1016/j.cca.2013.03.033. PubMed PMID: 23570820.

Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in indian men. *Int J Cancer.* 2003;686(January):681–6. doi: 10.1002/ijc.11114. PubMed PMID: 12740918.

Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(3):459-65. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.136. PubMed PMID: 14697210.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a)

Eu, JANETE DIAS ALMEIDA, Professora Titular da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do registro no Conselho Regional de Odontologia CROSP 40.530, telefone para contato (12) 3947 9078, irei coordenar um projeto de pesquisa cujo título é “ANÁLISE DO METABOLOMA E MICROBIOMA SALIVAR DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER BUCAL”. O projeto será desenvolvido pelas pesquisadoras: Cirurgiãs Dentistas Mariana de Sá Alves CROSP 130.004 e Nayara de Sá Rodrigues CROSP 120.220. O objetivo é realizar uma pesquisa sobre câncer bucal e a relação com os microrganismos e metabólitos salivares. Estudos no mundo todo, inclusive no Brasil, estão sendo realizados com o objetivo de se estudar as amostras salivares para identificar possíveis biomarcadores para auxiliar no diagnóstico precoce do câncer bucal, a fim de melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos pacientes. Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que tem a finalidade de estudar as características genéticas e biológicas do câncer bucal e compará-las com pessoas sem este tipo de câncer. Pode ser que você não seja diretamente beneficiado, mas futuros pacientes poderão ter algum tipo de benefício com o estudo. Sua participação neste projeto é totalmente voluntária, não existindo nenhum tipo de compensação, privilégio ou benefício. Caso você não aceite participar também não existe nenhum tipo de sanção ou prejuízo à sua avaliação e tratamento, sendo que você será acompanhado da mesma forma. Não existe nenhum tipo de remuneração, exceto, alguma cobertura de custo com alimentação ou transporte caso você seja procurado durante a pesquisa para algum tipo de esclarecimento e precise vir até nós. Você poderá contatar os pesquisadores através de telefone de nossa faculdade para esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca da pesquisa. Caso você aceite participar da pesquisa, você responderá a um questionário, com algumas perguntas sobre o uso de cigarro e de bebidas alcoólicas, alimentação, atividade profissional, hábitos sociais. Tais informações são CONFIDENCIAIS, e o sigilo absoluto está garantido.

Para o estudo, será necessário coletar cerca de 3,0 mL de saliva que você irá cuspir em um pote de plástico, para os pacientes com diagnóstico de câncer bucal e também para os pacientes sem diagnóstico de câncer bucal (grupo de pacientes controle). Para os pacientes com diagnóstico de câncer bucal, além da coleta da saliva será realizada também um raspado de células do interior da sua boca, que será feita com uma escova e um fragmento de 0,5 cm do tumor que será retirado durante o procedimento cirúrgico para diagnóstico e/ou tratamento. Pacientes sem lesão bucal serão convidados a participar para que as suas amostras salivares servirão de comparação com pacientes com câncer de boca. O material será adequadamente armazenado para ser utilizado posteriormente. Não existe risco de contaminação, uma vez que o material utilizado para coleta de saliva é descartável e o material utilizado nos procedimentos cirúrgicos é esterilizado. Em decorrência do procedimento cirúrgico, que poderá ser uma biópsia ou mesmo o tratamento você poderá sentir um pouco de dor, ter ferimento na boca semelhante a uma afta, irritação no local, infecção, ou ainda sangramento. Tais sintomas são os próprios sintomas decorrentes do procedimento, não havendo um agravamento pela participação no estudo. Você sairá do procedimento com receita e orientação para dor ou sangramento. Caso haja algum problema maior, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, e os mesmos o atenderão rapidamente para a resolução do problema. Na grande maioria das vezes isto não lhe trará nenhum prejuízo, pois não são complicações graves e nem vão alterar o seu tratamento. O material coletado será analisado nos laboratórios de Patologia Bucal, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia, ICT-UNESP, assim como no Laboratório Dempster de espectrometria de massas da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, USP. O material será armazenado em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Além disso, alguns materiais serão armazenados em blocos de parafina e ficará guardado por muitos anos, e poderá ser utilizado em outras pesquisas do mesmo tipo. Em nenhum momento da pesquisa será realizado algum tipo de manipulação genética ou modificação do DNA. Sua participação é voluntária e poderá trazer benefícios diretos para os estudos do impacto do tratamento do câncer, do tabagismo, etilismo ou outros fatores relacionados à doença. As informações obtidas serão analisadas sem que seu nome apareça. O Sr (a) tem o direito de ser informado acerca dos resultados finais ou parciais. Se tiver

alguma consideração ou dúvida sobre a ética do desenvolvimento do projeto, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética (CEP) do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, situado na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, São José dos Campos-SP, telefone (12) 39479028, e-mail ceph@fosjc.unesp.br e comunicar-se com a Coordenadora Profa. Dra. DENISE NICODEMO. Informo ainda, que está garantida a sua liberdade de retirada do consentimento e de participação a qualquer momento. Também não haverá custo nem pagamento pela sua participação voluntária.

Eu, portador do RG de _____ número declaro que, o pesquisador _____ me convidou a participar dessa pesquisa, tendo me explicado detalhadamente a finalidade, e lido comigo este termo de consentimento. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Autorizo a utilização das informações que serão por mim fornecidas ao responder os questionamentos e dos resultados obtidos. Declaro conhecer o que será feito, que foi garantida a confidencialidade e o acesso permanente aos esclarecimentos, e que minha participação não implicará em nenhum custo. Sendo assim, ACEITO participar. Caso seja de minha vontade posso desistir a qualquer hora sem que haja nenhum prejuízo ao meu tratamento.

Assinatura do paciente _____

Assinatura do Pesquisador _____

São José dos Campos, ____ de _____ de 20__.

APÊNDICE B – Ficha de coleta dos dados clínicos dos pacientes

Parte I – Identificação e questões relacionadas à frequência e quantidade consumida de cigarros e bebidas alcoólicas

Nome :	
Sexo:	Cor:
Idade:	Data Nasc:
Residência:	
Bairro:	Cidade:
Estado:	Fone:
Profissão:	
Você fuma?	
Se fuma, qual o tipo?	
Há quanto tempo?	
Qual a frequência do seu consumo de cigarros?	
Quantos cigarros/dia?	
Caso ex-fumante, parou há quanto tempo?	
Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?	
Sim	Não
Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?	
Diário (>1x/dia)	Diário (1 x ao dia)
1 a 3 vezes por semana	Mensal
Que tipo de bebida você consome quando bebe?	
Cerveja	Uísque
Batida	Vinho
Caipirinha	Outras
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
1 a 2	10 ou mais
3 a 4	Cerveja 350 ml
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
5 a 6	Vinho 120 ml
7 a 9	Destilado (<i>whisky</i> , <i>vodca</i> , <i>pinga</i>) 36 ml
Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?	
Sim	Não
Quando você bebe, consome mais cigarro?	
Sim	Não
Quanto a mais você consome?	

Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas ?	
Sim	Não
Quais?	
Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?	
Diário (>1x/dia)	1 a 3 vezes por semana
Diário (1 x ao dia)	Mensal
Faz uso de algum medicamento?	
Sim	Não
Qual(is)?	

Fonte: Bandeira, 2018.

Exame clínico:

1) Extra-bucal:

2) Intra-bucal:

Parte II - Estadiamento (TNM) e tratamento oncológico

Neoplasia de cavidade bucal		
Sítio primário (epicentro da lesão)	Palato duro	
	Soalho	
	Soalho Língua	Direito
		Esquerdo
		Anterior
	Língua	Ventre
		Dorso
		Bordo D
		Bordo E
	Gengiva	Superior
		Inferior
		Direita
		Esquerda
	Área retromolar D	
	Jugal D	
	Jugal E	
	Retromolar E	
Tratamento	Cirúrgico Exclusivo	
	Radioterápico Exclusivo	
	Quimioterápico Exclusivo	
	Cirurgia + Radioterapia Complementar	
	Cirurgia + Radioterapia E Quimioterapia Complementar	
	- Radioterapia + quimioterapia - Dose Radioterapia - Quimioterápicos utilizados - Protocolo Utilizado	
Estadiamento	TNM pré-operatório	
	TNM pós-operatório - Achados patológicos:	
	Margem livre X comprometida	
	Linfonodos livres X comprometidos	
	Extravasamento extra capsular	
	Estágio Clínico	

Fonte: Bandeira, 2018.

Parte III - Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros

1) Quanto tempo, logo após acordar, você fuma o 1º cigarro Dentro de 5 minutos (3) Entre 6-30 min (2) Entre 31-60 min (1) Após 60 min (0)
2) Para você é difícil não fumar em lugares proibidos? Sim (1) Não (0)
3) Qual dos cigarros que fuma durante o dia lhe dá mais satisfação? O primeiro da manhã (1) Os outros (0)
4) Quantos cigarros você fuma por dia? Menos de 10 (0) Entre 10-20 (1) Entre 21-30 (2) Acima 31 (3)
5) Você fuma frequentemente pela manhã? Sim (1) Não (0)
6) Você fuma mesmo doente, quando precisa ficar acamado a maior parte do tempo? Sim (1) Não (0)

Fonte: Fagerström, 2012

Pontos de Dependência Nicotínica

Grau de dependência	Pontuação do Fagerström
Muito baixa	0 a 2 pontos
Baixa	3 a 4 pontos
Moderada	5 pontos
Elevada	6 a 7 pontos
Muito elevada	8 a 10 pontos

Fonte: Fagerström, 2012

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: TABAGISMO E SUA INTERRELAÇÃO COM LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: ANÁLISE METABOLÔMICA E

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13282819.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.334.281

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem como proposição avaliar a expressão gênica e proteica de componentes da via de sinalização WNT e de DNA

metiltransferases (DNMTs) e, bem como o Metaboloma e Microbioma salivar, em casos de leucoplasia e carcinoma de células escamosas (CCE)

bucais. Para a análise de expressão dos genes WNT1, WNT5A, APC, CTNNB1, CCDN1, MYC, WIF1, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, por meio de RTq-PCR

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo

A presente proposta contempla a expressão gênica e protéica de integrantes das vias DNMTs e Wnt, o Metaboloma e Microbioma salivar que possam estar presentes no CCE e leucoplasia, afim de correlacioná-los ao perfil tabágico, etílico, sócio-demográfico e clínico dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para as amostras correspondentes a avaliação retrospectiva (alíquotas de RNA), os riscos são mínimos, sendo relativos a perda de confidencialidade das informações. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a manter os dados em sigilo e segurança. Para as amostras

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

correspondentes a avaliação prospectiva (amostras salivares), o voluntário terá o desconforto de ser submetido a um exame clínico intra e extrabucal e deverá depositar (cuspir) a saliva em um recipiente estéril, conforme instruções do pesquisador. A coleta da saliva não oferece riscos físicos, químicos ou biológicos ao paciente, pois não se trata de um procedimento invasivo, mas conforme mencionado anteriormente, poderá gerar algum

constrangimento. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a estar em ambiente privado (consultório) para a realização da coleta e ainda, a resguardar a confidencialidade dos dados obtidos.

Benefícios:

Identificar fatores prognósticos e possíveis biomarcadores, bem como auxiliar para o melhor entendimento da relação entre os metabólitos e a microbiota na carcinogênese bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa com 120 amostras de alíquotas de RNA e material salivar, parte já coletada e armazenada em nossa instituição, e parte a ser coletada de pacientes do ambulatório de propedêutica do ICT/UNESP São José dos Campos e da Universidade de Santiago de Compostela. Material já coletado com TCLE aprovado em nossa Instituição e material externo aprovado pelo Comitê de ética da Universidade de Santiago de Compostela.

A proposta da pesquisa é clara, com objetivo definido e com parceria internacional de qualidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos anexados estão em conformidade com as exigências da Plataforma Brasil.

TCLE, claro, conciso e adequado.

Cronograma bem programado

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://plataforma.brasil.gov.br/>:

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

//www2.ict.unesp.br/ – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1350479.pdf	07/05/2019 19:21:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/05/2019 19:13:32	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/05/2019 19:07:55	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Dispensa.pdf	06/05/2019 18:31:53	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/05/2019 18:30:28	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	06/05/2019 18:07:39	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_colaboracao.pdf	06/05/2019 17:56:04	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Maio de 2019

**Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

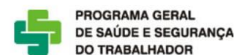
Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

ANEXO B – AUDIT – Teste de identificação de desordens devido ao uso de álcool



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



AUDIT – TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROBLEMAS RELACIONADOS AO USO DE ÁLCOOL

DADOS PESSOAIS				
NOME				
ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE				
O uso de álcool pode afetar sua saúde e pode interferir com algumas medicações e tratamentos. Por isso é importante que você responda sobre o seu uso de álcool. <u>Suas respostas permanecerão confidenciais.</u> Por favor, responda com toda a sinceridade. Assinale com "X" a alternativa que melhor descreve sua resposta a cada questão.		UM DRINK ou UMA DOSE = 150 ml de vinho 350 ml de cerveja 1 dose de destilado (whisky, vodka, pinga), 40ml, ou 1 coquetel:		
1. Com que frequência (quantas vezes por semana) você consome bebidas alcoólicas?				
() Nunca [0]	() Uma vez por mês ou menos [1]	() 2-4 vezes por mês [2]	() 2-3 vezes por semana [3]	() 4 ou mais vezes por semana [4]
2. Quantas doses de álcool você consome num dia normal?				
() 0 ou 1 [0]	() 2 ou 3 [1]	() 4 ou 5 [2]	() 6 ou 7 [3]	() 8 ou mais [4]
3. Com que frequência (quantas vezes por semana) você consome cinco ou mais doses em uma única ocasião?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
4. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você achou que não conseguiria parar de beber, uma vez tendo começado?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
5. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você não conseguiu fazer o que era esperado de você por causa do álcool?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
6. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você precisou beber pela manhã para poder se sentir bem ao longo do dia, após ter bebido bastante no dia anterior?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
7. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você se sentiu culpado ou com remorso após ter bebido?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
8. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você foi incapaz de lembrar o que aconteceu devido à bebida?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
9. Você já causou ferimentos ou prejuízos a você mesmo ou a outra pessoa após ter bebido?				
() Não [0]	() Sim, mas não no último ano [2]	() Sim, durante o último ano [4]		
10. Alguém ou algum parente, amigo ou médico, já se preocupou com o fato de você beber ou sugeriu que você parasse?				
() Não [0]	() Sim, mas não no último ano [2]	() Sim, durante o último ano [4]		
RESULTADO DO TESTE				
NOME RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TESTE				
DATA				

Consumo de baixo risco ou abstinência = 0 a 7 pontos

Consumo de risco = 8 a 15 pontos

Uso nocivo ou consumo de alto risco = 15 a 19 pontos

Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo = 40 pontos)

AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test): descrição, referências e instrumento.

Este instrumento, elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por BABOR et al (1992), compõe-se de 10 questões e tem por objetivo identificar possíveis dependentes de álcool. Foi traduzido e validado no Brasil por LIMA et al. (2001). As questões referem-se aos últimos 12 meses, sendo que as três primeiras medem a quantidade e frequência do uso regular ou ocasional de álcool, as três questões seguintes investigam sintomas de dependência e as quatro finais são a respeito de problemas recentes na vida relacionados ao consumo do álcool. O escore varia de 0 a 40 e sua pontuação pode ser feita de vários modos. Por exemplo, uma pontuação superior a oito indica a necessidade de um diagnóstico mais específico. Porém, atualmente, o próprio autor principal (BABOR & HIGGLE-BIDDLE, 2003) vem propondo quatro níveis de escore para o AUDIT, que sugeririam fazer (ou não) uma intervenção breve, inserida na atenção primária à saúde e dirigida aos profissionais de saúde. O escore, então, seria classificado como descrito abaixo:

- Consumo de baixo risco ou abstinência = 0 a 7 pontos
- Consumo de risco = 8 a 15 pontos
- Uso nocivo ou consumo de alto risco = 16 a 19 pontos
- Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo = 40 pontos)

O AUDIT, portanto, serve para o rastreamento dos possíveis casos, sendo um método simples para identificar pessoas com consumo de risco, uso nocivo e dependência do álcool.).

O padrão "*binge drinking*" ("beber com embriaguez" ou "tomando porre") enquadra-se dentro do consumo de alto risco, sendo que, para este, recomenda-se as seguintes atuações:

1. mostrar para o indivíduo que seu comportamento de beber é classificado como de risco;
2. encorajá-lo a reduzir o seu padrão de beber atual, apontando os riscos específicos a que está sujeito em decorrência do consumo acima do recomendável;
3. orientar no sentido de que a opção seja pelo beber de baixo risco ou pela abstinência, se o indivíduo concordar;



4. explicar o que seria um drinque ou dose-padrão e, pela definição, orientar sobre a quantidade máxima recomendada para o consumo do álcool, conforme o sexo e a condição clínica de cada um conforme figura abaixo, traçando metas que visem a diminuição gradual da ingestão alcoólica.



Recomendação para beber com pouco risco (pessoas saudáveis)

Homens: não mais que 2 drinques por dia;
não mais que 4 ocasião/semana

Mulheres (não-grávidas):
não mais que 1 drink por dia,
não mais que 3 ocasião/semana

Idosos: não mais que 1 dose por dia,
ou 2 doses ocasião/semana

Fonte: Dietary Guidelines for Americans, 1995. U.S. Departments of Agriculture and Health and Human Services, 1995.

5.instruir quanto aos prejuízos causados pelo álcool e os benefícios do uso moderado/abstinência.(13)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABOR, T.F & HIGGLE-BIDDLE, J.C. Intervenções breves para uso de risco e nocivo de álcool: manual para uso em atenção primária. Tradução CM Corradi, Ribeirão Preto, PAI-PAD, 2003, 52 p.

BABOR, T., HIGGINS-BIDDLE, J. C., SAUNDERS, J. B. & MONTEIRO, M. AUDIT: the alcohol use disorders identification test. Guidelines for use in primary health care. Department of Mental Health and Substance Dependence, World Health Organization, Geneva, 2001.

BABOR, T.F.; FUENTE, J.R.; SAUNDERS, J. & GRANT, M. AUDIT. The alcohol use disorders identification test: guidelines for use in primary health care. WHO (World Health Organization)/PAHO. 4:1-29, 1992.

LIMA, C., FREIRE, A.C.C., SILVA, A.P.B., TEIXEIRA, R.M., FARRELL, M. AND PRINCE, M. Concurrent and construct validity of the audit in an urban Brazilian sample. Alcohol Alcohol. **40**: 584-589, 2005.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES National Institutes of Health
 National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Helping Patients Who Drink Too Much. A CLINICIAN'S GUIDE. 2005